

Aus dem Institut für Immunologie  
des Medizinischen Zentrums für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
Direktor: Prof. Dr. med. D. Gemsa

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg und des  
Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg

**Charakterisierung der Ratten-Makrophagenzelllinien R2 und  
NR8383 und Untersuchung des Einflusses ausgewählter  
mineralischer Fasern und Partikel auf die Freisetzung  
immunologisch wirksamer Substanzen**

Inaugural Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Marc Wieckenberg  
aus  
Rheda-Wiedenbrück

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität

Marburg am 15.09.2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. D. Gemsa

Korreferent: Prof. Dr. D. Jones

## Inhaltsverzeichnis

1.	<i>Einleitung</i> .....	1
1.1.	Einteilung der Fasern und Partikel.....	1
1.1.1.	Fasern aus Titandioxid .....	1
1.1.2.	Kieselsäure.....	2
1.1.2.1.	Partikel aus Siliziumdioxid .....	2
1.1.2.2.	Silikate.....	3
1.1.2.2.1.	Feldspäte.....	4
1.1.2.2.1.1.	Keramikfasern .....	4
1.1.2.2.1.2.	Glaswolle .....	4
1.1.2.2.1.3.	Steinwolle .....	5
1.1.3.	Asbest.....	5
1.2.	Abwehrsysteme der Lunge.....	6
1.3.	Pneumokoniosen.....	11
1.3.1.	Klinische Aspekte der Pneumokoniosen.....	12
1.3.1.1.	Radiologische Zeichen der Pneumokoniosen.....	12
1.3.1.2.	Lungenfunktionsdiagnostik .....	13
1.3.2.	Pathologische Anatomie der Pneumkoniosen .....	14
1.4.	Die Silikose und assoziierte Erkrankungen.....	14
1.4.1.	Pathologische Anatomie der Silikose.....	15
1.5.	Vorstellungen zur Pathogenese der Pneumokoniosen .....	17
1.5.1.	Alveolarstaub und Translokation der Partikel .....	17
1.5.2.	Wirkung der Siliziumdioxidpartikel auf die Lunge .....	18
1.5.3.	Entzündung .....	21
1.5.4.	Fibrose.....	27
1.6.	Ziel der Arbeit .....	29
2.	<i>Material und Methoden</i> .....	31
2.1.	Isolierung und Kultur von Zellen .....	31
2.1.1.	Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	31
2.1.1.1.	Zellkulturmedium .....	31
2.1.1.2.	Kulturbedingungen .....	31
2.1.1.3.	Bestimmung der Zellzahl .....	32
2.1.1.4.	Endotoxinbestimmung mittels LAL-Tests.....	32

2.1.2.	Makrophagen-Zelllinien NR8383 und R2.....	33
2.1.2.1.	Allgemeine Beschreibung.....	33
2.1.2.1.1.	NR8383-Makrophagen .....	33
2.1.2.1.2.	R2-Makrophagen.....	33
2.1.2.2.	Kultur der Zelllinie.....	34
2.1.2.3.	Auftauen und Einfrieren.....	34
2.1.2.3.1.	Einfrieren .....	34
2.1.2.3.2.	Auftauen .....	35
2.1.2.4.	Mycoplasmentest.....	35
2.1.2.5.	Nitritnachweis .....	35
2.1.3.	Isolierung und Kultur primärer humaner Monozyten.....	36
2.1.3.1.	Isolation mononukleärer Zellen aus Blut.....	36
2.1.3.2.	Elutration von Monozyten .....	37
2.1.3.3.	Adhärenz .....	38
2.2.	In-vitro-Stimulation von Zellen .....	39
2.2.1.	Stimulation mit LPS und IFN- $\gamma$ .....	39
2.2.1.1.	Stimulation von NR8383- und R2-Makrophagen .....	39
2.2.1.2.	Stimulation humaner Monozyten .....	39
2.2.2.	Stimulation mit Fasern und Partikeln.....	40
2.2.2.1.	Herstellung steriler Faser- und Partikelpräparationen.....	40
2.2.2.2.	Stimulation von Zellen mit Fasern und Partikeln.....	42
2.2.2.3.	Stimulation von Zellen mit identischer Faser- und Partikelzahl.....	42
2.2.3.	Inkubation sowie Gewinnung der Zellkulturüberstände .....	43
2.3.	Nachweismethoden .....	43
2.3.1.	MTT-Test.....	43
2.3.2.	LDH-Test .....	44
2.3.3.	Nachweis von NO mittels Griess-Reaktion.....	45
2.3.4.	Nachweis von Zytokinen mittels ELISA .....	45
2.3.4.1.	Nachweis von Rattenzytokinen.....	47
2.3.4.2.	Nachweis humaner Zytokine .....	48
2.3.5.	Immunhistologie .....	49
2.3.5.1.	Herstellung von Zytospin-Präparaten .....	49
2.3.5.2.	Immunhistochemische Färbung.....	50
2.4.	Statistische Auswertung .....	50



3.	<i>Ergebnisse</i> .....	51
3.1.	Charakterisierung der Rattenzelllinien R2 und NR8383 .....	51
3.1.1.	Stimulation der Alveolarmakrophagenzelllinie NR8383 mit LPS und IFN- $\gamma$ .....	52
3.1.2.	Stimulation der Pleuramakrophagenzelllinie R2 mit LPS und IFN- $\gamma$ .....	57
3.2.	Ermittlung der toxischen Schwellendosis der verschiedenen Faser- und Partikelpräparationen .....	62
3.2.1.	Einfluß von Titandioxid auf die Vitalität von R2-Makrophagen.....	62
3.2.2.	Einfluß von $\alpha$ -Christobalit auf die Vitalität von R2-Makrophagen...	62
3.2.3.	Einfluß von Keramik auf die Vitalität von R2-Makrophagen.....	64
3.2.4.	Einfluß von Glaswolle auf die Vitalität von R2-Makrophagen .....	65
3.2.5.	Einfluß von Steinwolle auf die Vitalität von R2-Makrophagen.....	66
3.2.6.	Einfluß von Asbest auf die Vitalität von R2-Makrophagen .....	66
3.3.	Einfluß von Fasern und Partikel auf die Produktion von Mediatoren durch Makrophagen .....	68
3.3.1.	Stimulation der Makrophagenzelllinie NR8383 mit den Faser-/Partikelpräparationen .....	69
3.3.1.1.	Einfluß der Fasern und Partikel auf die Vitalität der NR8383- Makrophagen.....	69
3.3.1.2.	Einfluß der Fasern und Partikel auf die Produktion von NO-Radikalen durch NR8383-Makrophagen .....	70
3.3.1.3.	Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$ durch NR8383-Makrophagen .....	73
3.3.1.4.	Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von MCP-1 durch NR8383-Makrophagen .....	75
3.3.1.5.	Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von IL-1 $\beta$ durch NR8383-Makrophagen .....	77
3.3.2.	Stimulation der R2 Makrophagenzelllinie mit Fasern und Partikeln.....	81
3.3.2.1.	Einfluß der Fasern und Partikel auf die LDH-Freisetzung durch R2-Makrophagen .....	81
3.3.2.2.	Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von NO durch R2-Makrophagen .....	85

3.3.2.3.	Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$ durch R2-Makrophagen .....	88
3.3.2.4.	Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von MCP-1 durch R2-Makrophagen .....	90
3.3.2.5.	Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von IL-1 $\beta$ durch R2-Makrophagen .....	91
3.3.3.	Stimulation primärer humaner Monozyten .....	95
3.3.3.1.	Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von LDH durch humane Monozyten .....	95
3.3.3.2.	Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von MCP-1 durch humane Monozyten .....	97
3.3.3.3.	Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von NO, TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$ durch humane Monozyten .....	99
3.4.	Stimulation der Makrophagen mit identischer Fasern-/Partikelzahl .....	100
3.4.1.	Stimulation von NR8383 Makrophagen mit gleicher Faser- und Partikelzahl .....	105
3.4.1.1.	Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von LDH durch NR8383-Makrophagen .....	105
3.4.1.2.	Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von NO-Radikalen durch NR8383-Makrophagen .....	106
3.4.1.3.	Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$ durch NR8383-Makrophagen .....	107
3.4.1.4.	Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von MCP-1 durch NR8383-Makrophagen .....	108
3.4.2.	Stimulation von R2-Makrophagen mit gleicher Faser- und Partikelzahl .....	109
3.4.2.1.	Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von LDH durch R2-Makrophagen .....	109
3.4.2.2.	Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von NO-Radikalen durch R2-Makrophagen .....	110
3.4.2.3.	Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$ durch R2-Makrophagen .....	111

3.4.2.4.	Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von MCP-1 durch R2-Makrophagen .....	112
3.5.	Nachweis der Expression von iNOS mittels Immunhistochemie..	111
4.	<i>Diskussion</i> .....	116
4.1.	Gesundheitliche Gefährdung des Menschen durch MMVF .....	116
4.2.	Einflußgrößen der Pathogenität.....	132
4.3.	Fazit.....	137
5.	<i>Zusammenfassung</i> .....	138
6.	<i>Abkürzungen</i> .....	I
7.	<i>Quellenverzeichnis</i> .....	IV
8.	<i>Tabellarischer Lebenslauf</i> .....	a
9.	<i>Verzeichnis der akademischen Lehrer</i> .....	b
10.	<i>Danksagung</i> .....	c

## **1. Einleitung**

In der Industrie, im Heimwerkerbereich und auch im Wohnbereich werden zahlreiche Faser-Materialien (Steinwolle, Glaswolle, Keramik u.a.) wegen ihrer günstigen physikochemischen Eigenschaften als Isolatoren für Wärme, Kälte und Schall eingesetzt. Bei der Verarbeitung dieser Stoffe entstehen anorganische Stäube, die im Verdacht stehen, Erkrankungen des respiratorischen Systems hervorrufen zu können. In der Vergangenheit handelte es sich hierbei häufig um Asbestfasern und um Partikel aus Siliziumdioxid. Man kennt die gesundheitsgefährdenden Eigenschaften dieser Materialien, so daß mittlerweile chemisch und strukturell verwandte Substanzen zum Einsatz kommen, über deren biologische Wirkungen allerdings noch unzureichende Kenntnisse bestehen.

Insbesondere in der Lunge kann es zu akuten und chronischen Entzündungsreaktionen kommen. Während die akuten Entzündungsreaktionen eher selten zu schwerwiegenden Störungen des respiratorischen Systems führen, so gehören die chronischen Veränderungen der Lunge (Pneumokoniosen) auch heute noch zu den häufigsten Berufskrankheiten mit teilweise erheblichen gesundheitlichen Folgen.

### **1.1. Einteilung der Fasern und Partikel**

In der vorliegenden Arbeit sollte die mögliche Toxizität von Titandioxid, Steinwolle, Glaswolle und Keramik untersucht werden. Von Siliziumdioxid und Asbest war bereits bekannt, daß sie in der Lage sind, akute und chronische Schädigungen biologischer Systeme hervorrufen zu können. Diese Stoffe wurden daher als Vergleichssubstanzen eingesetzt. Im Folgenden werden zunächst die strukturellen und chemischen Unterschiede und Gemeinsamkeiten dieser Substanzgruppen dargestellt.

#### **1.1.1. Fasern aus Titandioxid**

In der Natur kommt Titandioxid in den Varianten *Rutil*, *Anatas* und *Brookit* vor. *Rutil* weist eine tetragonale Struktur auf. Es kommt zur Bildung von gestreckten

oder säuligen Kristallen bzw. feinsten Nadeln. In dem Kristallgitter ist jedes Titanion von 6 Sauerstoffionen umgeben, die die Ecken eines fast regelmäßigen Oktaeders bilden. *Anatas* ist eine tetragonale Modifikation des Titandioxids, während *Brookit* rhomboidisch ist. Reines *Titandioxid* kann synthetisch hergestellt werden. Es ist dann eine weiße, pulverige Substanz.

*Titandioxid* wird wegen seiner ausgeprägten Eigenschaften als Weißpigment in Anstrichfarben eingesetzt. Auch kommt es als Mattierungsmittel für Chemiefasern, als Zusatz von Glas- und Keramikrohstoffen, als Pigment oder Füllstoff für Kunststoffe und als Weißer in Zahnpasta sowie Sonnencreme zur Anwendung.

### **1.1.2. Kieselensäure**

Die Kieselensäuren sind die Sauerstoffsäuren des Siliziums, die in der Natur nur als Salze vorkommen und dann Silikate heißen. Unter Abspaltung von Wassermolekülen können sich die Monokieselsäuremoleküle ( $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ) aneinander lagern und lange Ketten bilden, die Polykieselensäuren ( $\text{H}_{2n+2}\text{Si}_n\text{O}_{3n+1}$ ). Je nach Anlagerung der Tetraedermoleküle der Monokieselsäure können Ketten, Bänder, Ringe und Netze entstehen. Der Grenzfall tritt auf, wenn alle vier Tetraederecken der Kieselensäure an der Kondensation beteiligt sind. Es entsteht Quarz oder dessen spezifische Formen mit der allgemeinen Formel  $(\text{SiO}_2)_n$ .

#### **1.1.2.1. Partikel aus Siliziumdioxid**

Siliziumdioxid (wasserfreie Kieselensäure) ist eine in zahlreichen Variationen vorkommende Sauerstoffverbindung des Siliziums. Man unterscheidet bei den kristallinen Formen Quarz, Christobalit und Tridymit.

In Abhängigkeit von Temperatur und Druck entstehen unterschiedliche Kristallgitter. Zwischen 870 und 1470°C entsteht Tridymit, welches eine stabile hexagonale Kristallstruktur aufweist. Diese Form nennt man auch Hochtemperatur-Tridymit oder  $\beta$ -Tridymit. Ab Temperaturen um 117°C geht es in eine metastabile rhomboide Modifikation über (Tieftemperatur-/ $\beta$ -Tridymit).

Dieses wandelt sich nun langsam in stabilen Quarz um. Tridymit weist in der Natur taflige Kristalle auf.

Christobalit besteht aus kleinen, trüben, milchweiß-farbenen oktaedrischen Kristallen. Sie entstehen ab einer Temperatur oberhalb von 1470°C. Verwendung findet dieses Mineral in der Herstellung feuerfester Ofensteine.

Unterhalb von 870°C bildet sich die stabile Form des kristallisierten Siliziumdioxids, die man Quarz nennt. Es ist die am häufigsten vorkommende kristalline Form des Siliziumdioxids. Man unterscheidet  $\alpha$ -Quarz (Nieder-/Tiefquarz), das bei Temperaturen bis 573°C entsteht und eine trigonal-trapezoedrische Kristallstruktur bildet, von  $\beta$ -Quarz (Hochquarz) mit hexagonal-trapezoedrischer Struktur. Dieses bildet sich bei Temperaturen ab 573°C. Quarz findet man in verschiedenartigsten Kristallausbildungen. Das Kristallgitter wird von nahezu regulären Tetraedern gebildet.  $\text{Si}_4^+$  ist immer von 4  $\text{O}_2^-$  umgeben. Die Sauerstoffatome sind dabei immer zwei Tetraedern gemein. Quarz findet man in reiner Form oder als Gemengbestandteil von magmatischen Gesteinen (Granit, Porphyr), metamorphen Gesteinen (Gneis, Glimmerschiefer) und Sedimentgesteinen (Sandstein). Es eignet sich als Rohstoff für Glas und Keramik. Auch findet es Verwendung in der Optik, Elektronik und Nachrichtentechnik (piezoelektrische Aktivität) oder als Schmuck (Bergkristall, Amethyst, Aventurin, Michquarz u.a.). Unter Druck entstehende kristalline Formen nennt man Keatit, Coesit und Stishovit.

#### **1.1.2.2. Silikate**

Als Silikate bezeichnet man die Salze und Ester der Monokieselsäure und deren Kondensationsprodukte. Während die organischen Silikate nur synthetisch herstellbar sind (z.B. die Ester der Mono- und Dikieselsäure), bilden die anorganischen Silikate eine bedeutsame Gruppe natürlich vorkommender Silizium-Sauerstoff-Verbindungen (Silikatminerale), die an der Zusammensetzung der Erdkruste und des Erdmantels beteiligt sind. Die Anionen dieser Silikate bestehen aus  $\text{SiO}_4$ -Einheiten, in denen je ein Siliziumatom tetraedrisch von vier Sauerstoffatomen umgeben ist. Diese  $\text{SiO}_4$ -Tetrader können über gemeinsame Sauerstoffatome miteinander verknüpft werden. Je nach Grad der Verknüpfung nimmt das Verhältnis von

Silizium zu Sauerstoff von 1:4 bis auf 1:2 ab. Je nach Aufbau des Anions unterscheidet man Nesosilikat, Sorosilikat, Cyclosilikat, Inosilikate (z.B. Hornblenden s.u.), Phyllosilikate und Tektosilikate. Zu letzteren gehört das Quarz als Grenzfall, da hier jedes Tetraeder mit 4 weiteren Tetraedern kondensiert ist, so daß das Verhältnis Sauerstoff zu Silizium 1:2 beträgt. Weitere Tektosilikate werden dadurch gebildet, daß z.T. niedrigerwertige Elemente (z.B. Aluminium) das Silizium ersetzen. Die wichtigsten Tektosilikate sind Feldspäte mit dem Anion  $(\text{AlSi}_3\text{O}_8)^-$ , sowie zahlreiche Feldspatvertreter (verminderter Kieselsäuregehalt).

#### **1.1.2.2.1. Feldspäte**

Feldspäte machen ca. 60% aller Mineralien aus. Chemisch gesehen bestehen sie aus Natrium, Kalium und Kalziumalumosilikaten. Grob unterscheidet man zwischen den Alkali- (natrium und kaliumhaltig) und den Kalknatronfeldspäten (natrium- und kalziumhaltig). Die Feldspäte werden als Rohstoffe für die Keramikherstellung und in der Glasindustrie verwandt.

##### **1.1.2.2.1.1. Keramikfasern**

Keramikfasern sind anorganische Chemiefasern. Die Herstellung erfolgt aus einer Schmelze von Aluminium und Siliziumoxid mit einem Zusatz von Boroxid. Diese Fasern sind hochhitzebeständige, gegenüber den meisten Chemikalien unempfindliche Isoliermaterialien. In den späten 40er Jahren verwandte man diese Aluminiumsilikate noch ausschließlich in der Flugzeugindustrie. Seit den 60er Jahren allerdings kam es zum breiten Einsatz dieser Isoliermaterialien (Wojtczak J, 1994), so daß man sie heute in industriellen Hochöfen, Heizungen und Reaktoren findet.

##### **1.1.2.2.1.2. Glaswolle**

Aus aufgeschmolzenem Rohglas oder unmittelbar aus einem geschmolzenen Gemenge entstehen die Glasfasern (Glaswolle) durch Ziehen, Schleudern oder Blasen. Die entstehenden Fasern werden mit einem Schmelzmittel (Olivenöl,

Olein, Mineralölprodukte) bestäubt und aufgespult. Zur Verbesserung der chemischen Beständigkeit werden diese Fasern noch mit Kunstharzen oder Lacken überzogen. Glasfasern eignen sich zur elektrischen Isolierung, Wärmeisolierung, Schalldämpfung, Filterung und finden Anwendung in der Glasfaseroptik.

#### **1.1.2.2.1.3 Steinwolle**

Steinwolle ist ein aus einem Glasfluß, durch Schmelzen von flußmittelreichen Gesteinen (evtl. auch unter Zugabe von Flußmitteln) erzeugtes Mineral. Mittels Verblasen durch Platindüsen entstehen die Fasern. Als Flußmittel, die zur Erniedrigung des Schmelzpunktes und zur Erzielung einer dünnflüssigen, reaktionsfähigen Schlacke dient, kommen basische Flußmittel (Kalkstein, Soda, Eisenoxid), saure Flußmittel (Quarzsand, Glas, Tonschiefer, Bauxit) und neutrale Flußmittel (Flußspat, Borax, Zink, Natriumchlorid, Ammoniumchlorid) zum Einsatz.

#### **1.1.3. Asbest**

Asbest ist eine Sammelbezeichnung für viele Untergruppen. Man unterscheidet das weiße Asbest (Serpentin-Asbest) von dem bläulichen Asbest (Hornblenden-Asbest).

Serpentin ist biegsam, widerstandsfähig gegen Hitze und schwache Säuren. Man stellte aus ihm feuerfeste Schutzkleidung, Filtertücher der chemischen Industrie, Isoliermaterialien, Dichtungsmaterialien, Bremsbänder, Bremsbeläge Kupplungsbeläge und Asbestzement für Platten und Rinnen her. Es kommt in dichten faserigen oder blättrigen Aggregaten vor. Es ist ein muschelig oder splittrig brechendes, meist grünes Material. Chemisch besteht es hauptsächlich aus  $\text{Mg}_6[(\text{OH})_8\text{Si}_4\text{O}_{10}]$  mit den wichtigsten Nebenbestandteilen  $\text{FeO}$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  und  $\text{NiO}$ . Als Hauptvertreter kommen Chrysotil und Antigorit vor.

Hornblenden (griechisch Amphibole) bilden eine Gruppe verbreiteter Kalzium-Magnesium-Silikatminerale mit oder ohne Eisen- bzw. Aluminiumanteilen. Es hat einen nichtmetallischen Glanz und ist von bräunlich-grünem Strich. Die Kristallform ist überwiegend monoklin, seltener orthorhombisch. Es bilden sich



oft stenglig-faserige Aggregate, die als Hornblenden-Asbest bezeichnet werden. Man unterscheidet monokline und orthoamphibole Hornblenden. Zu ersteren gehören die Vertreter der Strahlsteingruppe (eisenarm und ohne Aluminium) Nephrit, Strahlstein und Tremolit. Das grünlichschwarze Hornblenden ist aluminium- und eisenhaltig und hat einen hohen Gehalt an Tonerde. Das schwarze basaltige Hornblenden weist einen hohen Gehalt an  $\text{FeO}_3$  auf. Schließlich gibt es Natron-Hornblenden (Alkali amphibole), es ist natriumhaltig und die Hauptvertreter sind Arfwednosit, Glaukophan, Riebeckit und Krokydolith. Zu den Orthoamphibolen zählt man das Anthophyllit und das Holmquistit.

Von dieser Vielzahl an Fasern gelten sechs als die Haupttypen des Asbests: Chrysotil, Amosit, Krokydolith, Anthophyllit, Tremolit und Aktinolit (durch Eisenoxid dunkelgrün gefärbter Strahlstein). Für Chrysotil schätzt man, daß es 1977 in 95% der kommerziellen Anwendungen von Asbest zum Einsatz kam (Becklake, 1983).

## **1.2. Abwehrsysteme der Lunge**

Für das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Fasern/Partikeln und der Lunge ist es notwendig, die Abwehrsysteme dieses Organs zu kennen. Um die größte epitheliale Oberfläche des Körpers zu schützen, bedarf es eines komplexen Verteidigungssystems, das die Lunge vor Schädigungen durch inhalede Stoffe, Partikel und Mikroorganismen bewahrt. Nach der Lokalisation kann man zwei Systeme voneinander unterscheiden. Diese sind in Tabelle 1 zusammengefaßt (Nicod 1999).

Tabelle 1: Einteilung der Abwehrsysteme der Lunge nach deren Lokalisation  
(Nicod 1999)

Obere Luftwege und Bronchien	Abwehr lokalisiert im Alveolarraum
Anatomische Barriere	Alveolarmakrophagen
Husten	Immunglobuline und Opsonine
Mukoziliärer Apparat	Lymphozyten bedingte Immunität
Bronchialepithel	Granulozyten
Sekretorisches IgA	
Netzwerk dendritischer Zellen	
Lymphatische Gewebe	

Als *anatomische Barriere* bezeichnet man den Nasopharyngealraum. Er verhindert, daß Strukturen von mehr als 3 µm Länge den Alveolarraum erreichen können. Sie bleiben an der Mukosa haften und werden wieder eliminiert.

Mikroorganismen, Schleim und Partikel werden durch *Hustenstöße* aus den großen Bronchien und der Trachea entfernt. Ausgelöst werden diese durch mechanische, chemische oder entzündliche Reize (Widdicombe 1995).

Substanzen, die in tiefer gelegene Strukturen vorgedrungen sind, werden durch den *Mukus* (Mukoglukoproteine, Proteoglykane und Phospholipide) der Luftwege gebunden. Er besteht aus einer Solphase und einer darüber liegenden Gelphase. Mit Hilfe eines koordinierten Zilienschlags kann dieser Schleimfilm nach oral abtransportiert werden. Im Schleim finden sich außerdem IgA, Lysozym, Laktoferrin und Peroxidasen, Stoffe, die für eine erfolgreiche Abwehr von Pathogenen notwendig sind.

Eine mechanische Grenze bildet das *Bronchialepithel*. Dieses flimmernde Zylinderepithel weist zahlreiche Zell-Zell-Kontakte auf, die auf die mechanische Bedeutung dieser Struktur hinweisen. Die Zellen sind durch gap junctions miteinander verbunden und bilden ein funktionelles Synzytium, von dem man annimmt, daß diese Form für die Koordination des Zilienschlags notwendig ist (Sanderson et al. 1988; Sanderson et al 1994). Das Bronchialepithel ist gleichsam Ursprung und Zielstruktur einer ganzen Reihe immunologisch wirksamer Substanzen. Eicosanoide, Chemokine (IL-8, GRO $\alpha$  GRO $\gamma$ , MCP-1-

3), Wachstumsfaktoren (GM-CSF, G-CSF, M-CSF) und Zytokine (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-11, IL-16) sind für die Interaktion des Bronchialepithels mit immunkompetenten Zellen notwendig. Außerdem werden während einer Entzündung sogenannte Adhäsionsmoleküle, z.B. ICAM-1, auf Epithelien vermehrt exprimiert. Hierdurch wird eine raschere Migration von Neutrophilen und Monozyten in das Entzündungsgebiet ermöglicht. Nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  nimmt die Dichte der MHC-Moleküle (major histocompatibility complex) der Klasse I und II auf den Bronchialepithelien zu. Damit scheinen Bronchialepithelzellen in der Lage zu sein, immunkompetenten Zellen Antigene zu präsentieren.

*Sekretorisches IgA*, das als ein Bestandteil des Mukus eine wichtige protektive Aufgabe besitzt, wird durch B-Lymphozyten gebildet und mittels transzellulärem Transport aus der Lamina propria in das Lumen des Bronchialbaums transportiert.

Unterhalb der Basalmembran des Bronchialepithels findet man ein dichtes Netzwerk an *dendritischen Zellen*, die nach Aufnahme und Verarbeitung von Antigenen in die T-Zell-Regionen der drainierenden Lymphknoten migrieren und diese dort den Lymphozyten präsentieren (Sertl et al., 1986; Holt et al., 1994).

Eine weitere wichtige Struktur ist das *lymphatische Gewebe* der Lunge. Lymphatisches Gewebe der Mukosa enthält neben CD4- und CD8-positiven  $\alpha/\beta$ -T-Lymphozyten, NK-Zellen sowie  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Wahrscheinlich spielen die beiden zuletzt genannten Zellen eine wichtige Rolle bei der Initiierung einer Antwort durch Th-1- bzw. Th-2-Zellen (abhängig vom spezifischen Erreger), da sie für ihre Aktivierung keine antigenpräsentierenden Zellen benötigen (Ferrick et al., 1995). Weitere lymphatische Strukturen sind die Lymphknoten und submuköse lymphatische Aggregate, die besonders in den Verzweigungen der Bronchien auftreten. Diese als BALT (bronchus associated lymphatic tissue) bezeichneten Aggregate sind vergleichbar den Peyerschen Plaques im Darm.

*Alveolarmakrophagen* bilden eine zentrale Säule des Abwehrsystems distal der terminalen Bronchien. Makrophagen sind in der Lage, inhalierte partikuläre Strukturen zu phagozytieren. Nach der Phagozytose von Fremdkörpern entstehen Phagosomen, die mit Lysosomen verschmelzen und fortan als Phagolysosomen bezeichnet werden. Hier erfolgt der Abbau der Fremdkörper und somit in der Regel deren Inaktivierung. Meist werden diese Makrophagen

mit Hilfe des mukoziliären Apparats nach außen transportiert. Einige von ihnen können allerdings auch den Weg zurück ins Parenchym finden und in den drainierenden Lymphknoten anderen immunkompetenten Zellen Antigene präsentieren (Thepen et al. 1993). Darüber hinaus sind Makrophagen an der Regulation vieler Prozesse durch Freisetzung verschiedener Mediatoren beteiligt. Sie spielen eine Rolle bei der Initiation der Immunantwort durch die Freisetzung von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  und konsekutiver Produktion von IL-8, MIP-1 $\alpha/\beta$ , RANTES, MCP-1/3, GM-CSF, G-CSF, M-CSF. Diese Zytokine können auch die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelien und Epithelien induzieren, wodurch die Einwanderung von Entzündungszellen deutlich beschleunigt wird. Makrophagen sind auch für die Bildung von Eicosanoiden verantwortlich (TXA<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, 5-HETE, PGE<sub>2</sub> und PGD<sub>2</sub>) (Nicod 1999).

Um eine überschießende Reaktion zu vermeiden, können Alveolarmakrophagen ihre eigenen Mediatoren (IL-1 und TNF- $\alpha$ ) durch Freisetzung von IL-1-Rezeptor-Antagonist und löslichem TNF-Rezeptor antagonisieren (Galve-de Rochemonteix et al. 1996) oder deren Bildung durch IL-10 blockieren (Nicod et al. 1995). Darüber hinaus besitzen Makrophagen bakterizide Eigenschaften. Lysozym, reaktive Sauerstoffmetabolite (Superoxidanion, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale) und Stickstoffmetabolite (Stickstoffmonoxidradikale, Nitrit, Nitrat) sind Substanzen mit starken antimikrobiellen Eigenschaften.

Makrophagen sind an dem Reparationsprozeß und am Remodelling nach Schädigung der Lunge durch die Bildung von Enzymen (Metalloproteinasen und deren Inhibitoren, Urokinase, saure Hydrolasen) und Wachstumsfaktoren (FGF, TGF, PDGF) beteiligt (Nicod et al. 1999).

Interessanterweise können Makrophagen Eigenschaften von dendritischen Zellen erlangen, somit sind sie in der Lage, T-Zellen zu aktivieren (Nicod et al. 1997). Für IL-12 konnte kürzlich eine zentrale Stellung bei der Initiation einer Th1-Antwort nachgewiesen werden (Isler et al. 1999). Nach Stimulation mit LPS und IFN- $\gamma$  oder nach Interaktion von CD40-Ligand der T-Zellen mit CD40 der Makrophagen wird von letzterem IL-12 gebildet.

Neben den Alveolarmakrophagen lassen sich weitere zelluläre Elemente im Alveolarbereich nachweisen. 10% der intraalveolären Zellen sind Lymphozyten. Davon sind 50% CD4-, 30% CD8-T-Zellen, 10-15% NK-Zellen sowie 5% B-Zellen.

Eine zentrale Rolle im Abwehrsystem der Lunge spielt die Lymphokinproduktion der beiden CD4-positiven T-Zell-Subtypen Th1 und Th2. IFN- $\gamma$  und IL-2 sind die Hauptprodukte einer Th1-Antwort. IL-4, IL-5 und IL-10 stellen die Reaktion aktivierter Th2-Zellen dar, während beide Typen IL-3, GM-CSF und TNF- $\alpha/\beta$  produzieren können. Th1-Zellen aktivieren durch ihre Zytokine vor allem Makrophagen und induzieren eine IgG2a-Antwort. Th2-Zellen helfen bei der Produktion von IgG1, IgA und IgE. Zytokine dieser Zellen locken Basophile und Eosinophile an den Ort der Entzündung (Chemotaxis). Unklar ist zur Zeit noch, durch welche Mechanismen es zu einer Th1- bzw. Th2-dominierten Antwort kommt. Man nimmt an, daß aktivierte Makrophagen durch die Synthese von IL-12 eine Th1-betonte Antwort auf einen Erreger auslösen (Hsieh et al. 1993). Th2-Lymphozyten spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese einiger granulomatöser Erkrankungen wie z.B. bei der Schistosomiasis (Chensue et al. 1992).

Während einer Entzündungsreaktion können außer Monozyten/Makrophagen besonders auch neutrophile Granulozyten an die Stelle der Entzündung gelockt werden. Während geringfügigere Erregerinvasionen noch durch Makrophagen allein bewältigt werden können, sind es Neutrophile, die bei ausgeprägteren Infektionen für die Elimination der Bakterien sorgen (Onofrio et al. 1983). Das Anlocken dieser polymorphnukleären Zellen geschieht durch Chemokine (IL-8, GRO  $\alpha/\beta$ ), die durch mononukleäre Phagozyten, Endothelzellen und Zellen des Bronchialepithels freigesetzt werden. Aktivierte Makrophagen produzieren außerdem 5-/11-HPEPE und LTB<sub>4</sub> (Valone et al. 1985), die ebenfalls chemotaktisch wirksame Substanzen darstellen. Die neutrophilen Granulozyten sorgen durch Phagozytose, Freisetzung von aktivierten Sauerstoffderivaten und zytotoxischen Peptiden sowie Proteinen für die Elimination der eindringenden Mikroorganismen.

Darüberhinaus lassen sich zahlreiche regulatorisch und effektorisch wirksame Substanzen in der Flüssigkeit der Bronchien und Alveolen nachweisen. Neben Surfactant, Fibronectin und CRP findet man auch *Immunglobuline*. Während

IgA praktisch nur in proximalen Bereichen des respiratorischen Systems vorkommt, findet man in den tieferen Kompartimenten bevorzugt Subtypen von IgG (Merrill et al. 1985). Als weiteren Bestandteil findet man Proteine des Komplementsystems. Das Komplementsystem spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von Erregern durch *Opsonisation* und Anlockung immunkompetenter Zellen (Gross et al. 1978; Robertson et al. 1976).

### 1.3. Pneumokoniosen

Pneumokoniosen sind Lungenerkrankungen, die durch inhalierte anorganische Stäube ausgelöst werden. Meist sind diese Stäube von kristalliner Struktur und enthalten Siliziumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) oder Silikate ( $\text{Me}_x\text{-SiO}_4$ ) (Riede und Schaefer 1993). In der Praxis ist es allerdings üblich, die Pneumokoniosen als Erkrankungen der Lunge zu bezeichnen, die im Rahmen einer beruflichen Exposition auftreten können (Thurlbeck und Churg 1995). Hierzu zählt dann auch die durch organische Stäube provozierte exogen-allergische Alveolitis. Letztere findet in dieser Arbeit allerdings keine Berücksichtigung.

Grundsätzlich kann man zwei Formen der Pneumokoniosen unterscheiden. Zu den *benignen* Pneumokoniosen zählt man die Lungenerkrankungen, die nicht mit einer toxischen oder allergisch-pathogenen Reaktion einhergehen: die Eisenoxidlungensiderose, die Barytose (Schwerspatstaub), die Anthrakose (reiner Kohlenstaub) und die Tabakose (Tabakstaub).

*Maligne* Pneumokoniosen gehen mit fibrotischen Veränderungen des Lungengewebes einher. Verursacht werden sie durch Siliziumdioxid (Silikose), Asbest (Asbestose), Talkum (Talkose) und Kaolin (Silikatose), durch Metallstäube wie Beryllium (Berylllose), Aluminium (Aluminose) und Hartmetalle (Staub von Sinter- und Gußkarbiden) (Psychrembel, 1990). Thurlbeck und Churg (1995) geben allerdings zu bedenken, daß alle Stäube, abhängig von der Dosis und Dauer der Exposition potentiell in der Lage seien, eine Fibrose zu induzieren; es gäbe folglich keinen echten inerten Staub.

### **1.3.1. Klinische Aspekte der Pneumokoniosen**

Die klinische Manifestation ist unspezifisch und kann durch alle anderen Erkrankungen der Lunge imitiert werden. Das Kardinalsymptom ist die Dyspnoe (Morgan et al. 1984). Husten, Dyskrie und evtl. durch das exponierte Material gefärbter Schleim können vorhanden sein (Industrie-Bronchitis). Als Zeichen einer interstitiellen Fibrose, z.B. bei der Asbestose, kann man basale feine Rasselgeräusche wahrnehmen. Patienten, die hohen Konzentrationen von Rauch, Gasen und Metalldämpfen ausgesetzt waren, können das Bild eines ARDS zeigen. Als Komplikation aller fibrosierender Lungenerkrankungen mit konsekutiver pulmonaler Hypertonie gilt die Entstehung eines Cor pulmonale.

#### **1.3.1.1. Radiologische Zeichen der Pneumokoniosen**

Zusammen mit der anamnestischen beruflichen Exposition, gilt die radiologische Diagnostik als Grundstein der Diagnose. Die Veränderungen im Röntgenbild sind allerdings unspezifisch, so daß sie im Kontext mit anderen Informationen interpretiert werden müssen. Ursprünglich wurde zur Bewertung von nodulären Läsionen der Silikose eine standardisierte Klassifikation durch die ILO (International Labor Office, 1980) entwickelt. Neuerdings ist dieses radiologische Schema auf die Asbestose und andere Pneumokoniosen erweitert worden. Anhand dieses Schemas sind die Bilder mit standardisierten a.-p. (anterior-posterior) Bildern zu vergleichen und auszuwerten. Zu beachten sind die technische Qualität, parenchymatöse Veränderungen und Läsionen der Pleura oder anderer Strukturen.

Parenchymatöse Läsionen werden je nach Ausdehnung in 4 Kategorien mit je 3 Subkategorien unterteilt, ausgehend von Kategorie 0 (normal) bis Kategorie 3 (ausgeprägt). Kleine Verschattungen gliedert man weiter nach deren Form in irregulär (interstitielles Muster z.B. Asbestose) oder rund (noduläres Muster z.B. Silikose). Abhängig vom Durchmesser werden diese noch weiter unterteilt: Große Verschattungen (größer als 1 cm) gelten als Zeichen einer komplizierten Pneumokoniose (PMF) und werden größenabhängig den Kategorien A, B und C zugeteilt.

Läsionen der Pleura und der weiteren Strukturen werden nach Art (umschrieben oder diffus), Lokalisation, Breite, Ausdehnung und nach eventuell vorhandenen Verkalkungen eingeteilt.

### **1.3.1.2. Lungenfunktionsdiagnostik**

Die Lungenfunktionsdiagnostik ermöglicht durch Messungen der statischen und dynamischen Lungenfunktion die Einteilung der Pneumokoniosen in drei Formen: Latente Formen (ohne meßbare Einschränkungen), Formen, die mit einer Atemwegsobstruktion einhergehen und Formen, die durch ein restriktives Muster gekennzeichnet sind. Auch gibt es die Kombination von Obstruktion und Restriktion. Zusätzlich kann man auch gelegentlich eine eingeschränkte Diffusionskapazität nachweisen.

### **1.3.2. Pathologische Anatomie der Pneumokoniosen**

Als Staubablagerungen bezeichnet man nicht-palpable, nicht-fibrotische Läsionen, die mikroskopisch aus Staub bestehen. Dieser kommt entweder frei oder innerhalb von Makrophagen vor. Vor allem findet man diese Läsionen in der Nähe der kleinen Atemwege und Gefäße. Bei einer pathologischen Ausdehnung der Ablagerungen bezeichnet man diese z.B. als Siderose. Die Ablagerungen können je nach Material unterschiedlich gefärbt sein: Schwarz bei Kohle, grau bei Zinn, weiß bei Titandioxid. Mit zunehmender Expositionsdauer und -dosis findet man neben den reinen Ablagerungen zusätzlich eine Fibrose. Man bezeichnet dieses Bild dann als „small airway disease“, als Erkrankung der kleinen Atemwege. Initial sind dies noch lineare Kollagen- und Pigmentablagerungen im Bereich der kleinsten Bronchiolen. Später dann kommt es durch zunehmende Verdickung der Wände zur Verziehung der Luftwege. Als Maximalvariante zeigt sich eine zentrale narbige Läsion umgeben von einem perifokalem zentrilobulärem Emphysem. Bei den meisten Pneumokoniosen ist das Vorkommen einer interstitiellen Fibrose eher selten.



#### **1.4. Die Silikose und assoziierte Erkrankungen**

Es gibt Hinweise darauf, daß es schon in der Altsteinzeit Fälle von Silikose gegeben hat (Hunter 1985). Auch die Griechen, Römer und Ägypter kannten die Gefahr, die vom Siliziumdioxid ausging. Bei Untersuchungen ägyptischer Mumien konnte man klassische silikotische Knötchen nachweisen (Thurlbeck und Churg 1995). In dem späten 19. und frühen 20. Jahrhundert entwickelte sich die Silikose zu einem großen Problem für die Arbeiterschaft (Davis und Gemsa D 1996). 1929 fand man in Barre, Vermont unter Arbeitern, die länger als 10 Jahre in der Steinbruch- und Steinmetzindustrie gearbeitet hatten, eine Erkrankungsprävalenz von über 75% (Russel et al., 1929). In den frühen 30er Jahren ereignete sich eine Katastrophe, die als einer der größten Industrieunfälle der Vereinigten Staaten in die Geschichte eingehen sollte. Während Tunnelarbeiten in West Virginia kam es unter den Arbeitern zum Ausbruch der akuten Form der Silikose. Unzählige Menschen fielen dieser zum Opfer. Dieses Ereignis gilt als Geburtsstunde für die Entwicklung von Staub-Kontroll-Standards (Cherniack 1986). Um die Arbeiterschaft vor einer zu hohen Staubkonzentration zu schützen, wurden Sicherheitsstandards eingeführt. Seither kam es zu einem deutlichen Abfall der Morbidität in den Ländern, die diese Grenzwerte als Sicherheitsstandards einhielten (Graham 1992). Studien bezüglich der Neuerkrankungen in der Schweiz verdeutlichen diesen Zusammenhang: Seit den 30er Jahren nahm die jährliche Zahl der Neuerkrankungen zunächst zu, bis schließlich 1940-1960 ein maximales Niveau von ca. 200-300 Neuerkrankungen pro Jahr erreicht wurde. Seither fiel die Inzidenz, initial langsam, um dann ab 1974 (ca. 100 Fälle pro Jahr) deutlich zu sinken. 1989 betrug schließlich die Anzahl der Neuerkrankungen nur noch 30-50 pro Jahr mit weiter sinkender Tendenz (Vu-Duc et al. 1999). Neuere Studien fordern allerdings, daß die von der OSHA (Occupational Safety and Health Administration) eingeführten Standards von  $0,1 \text{ mg/m}^3$  weiter gesenkt werden und die von der NIOSH (National Institute for Occupational Health and Safety) empfohlenen Normen von  $0,05 \text{ mg/m}^3$  eingehalten werden. Da es keine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung gibt, könnte die Inzidenz der Silikose überproportional gesenkt werden (Finkelstein MM, 2000). Das Hauptproblem

besteht allerdings in den Ländern der dritten und vierten Welt, in denen solche Industriestandards nicht gelten bzw. nicht kontrolliert und eingehalten werden. Laut Thurlbeck und Churg (1995) sind die Hauptquellen der Siliziumdioxidexposition am Arbeitsplatz Sandstrahlarbeiten, Schleifen, Bergarbeiten, Steinbruch- und Tunnelarbeiten, Gießereiarbeiten sowie Arbeiten in der Keramik- und Emaille-Manufaktur. Allerdings muß man auch von der Existenz von Arbeitsplätzen ausgehen, bei denen die Siliziumdioxidexposition eine *unerkannte* Gefahr darstellt und bei denen somit Industriestandards nicht zur Anwendung kommen (Graham 1992).

#### **1.4.1. Pathologische Anatomie der Silikose**

Die akute Silikose entsteht nach der Exposition mit frisch gemahlenem Siliziumdioxid in hohen Dosen. Sie ist die rapid progressive Form der Silikose mit einer hohen Letalität. Intraalveolär findet sich ein protein- und lipidhaltiges Exsudat. Die akute Silikose wird deshalb zu den Alveolarproteinosen gerechnet. Histologisch zeigt sich in der HE-Färbung ein fein granuliertes, tief pink gefärbtes Exsudat, gelegentlich mit Cholesteroleinschlüssen. In der Regel findet man eine interstitielle Pneumonie und frühe Formen der silikotischen Knötchen. Umrandet wird dieses Exsudat von hyperplastischen und hypertrophierten Typ-II-Pneumozyten. Man nimmt an, daß es durch die Siliziumdioxidexposition zur Stimulation von Typ-II-Zellen kommt, die dann vermehrt Surfactant und SP-A synthetisieren (Hook 1991).

Bei der chronischen Form der Silikose entwickeln sich die klassischen Knötchen innerhalb von Jahren und Jahrzehnten. Es handelt sich hierbei um runde, blasse, fibrotische, feste Knötchen, die sich scharf vom angrenzenden Lungenparenchym abgrenzen. Die viszerale Pleura kann ebenfalls befallen sein. Die Veränderungen bezeichnet man als Kerzenwachsläsionen. Des weiteren sind Regionen mit dichtem Lymphabfluß betroffen wie die interlobulären Septen und das peribronchiale Bindegewebe.

Von einer PMF (progressive massive fibrosis) spricht man, wenn kleinere Knötchen zu einem Konglomerat verschmelzen. Nach Definition der ILO (International Labor Office) müssen diese im Röntgenbild eine Größe von mehr als einem Zentimeter aufweisen (International Labor Office 1980). Typisch ist

ein symmetrischer Befall beider Lungenflügel. Kavernenbildung ist nicht ungewöhnlich und resultiert aus der Destruktion von Parenchym und bronchovaskulären Strukturen. Durch die spätere Kontraktion des narbigen Gewebes kommt es zu Verziehungen der Lungenstrukturen.

Histologisch sind die Knötchen nicht zu verwechseln. Konzentrische Lagen von Kollagen und gelegentliche Verkalkungen werden von Staub phagozytierenden Makrophagen, Fibroblasten und gelegentlich von Lymphozyten umrandet. Eventuell gelingt der Nachweis von intrazellulären Partikeln. Der Nachweis einer „small airway disease“ und auch von Silikosegranulomen in der Peripherie allein rechtfertigt nicht die Diagnose einer Silikose. Nur der Parenchyembefall ist letztendlich beweisend für das Vorliegen dieser Erkrankung (Murray et al. 1991).

Zu einer interstitiellen Fibrose kommt es vor allem, wenn die Arbeiter einer Kombination von Siliziumdioxid und Silikaten ausgesetzt werden oder der Staub reich an Christobalit ist. Auch bei der klassischen Form der Silikose zeigt sich gelegentlich eine interstitielle Faservermehrung in Kombination mit den typischen nodulären Veränderungen (Vigliani et al. 1948; Pintar et al. 1976). Je ausgeprägter sich die Silikose präsentiert, desto größer ist auch das Risiko, daß sich eine pulmonale Hypertonie hinzugesellt. (Murray et al. 1993). Ebenso kann ein zentriazinäres Emphysem mit der Silikose vergesellschaftet sein. Zusammenfassend sind die verschiedenen Krankheitsformen nach Siliziumdioxidexposition in der Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht über die Krankheitsformen der Silikose

Krankheitsformen nach Siliziumdioxidexposition
Akute Silikose
Chronische Silikose
- einfache Silikose
- komplizierte Pneumokoniose
- rheumatoide Pneumokoniose
- „small airway disease“
- Emphysem
- interstitielle Fibrose

Zahlreiche weitere Erkrankungen stehen ebenfalls im Verdacht, durch Siliziumdioxidstäube verursacht zu werden. Neben der chronischen Niereninsuffizienz (Rosenman et al. 2000), werden auch Autoimmunerkrankungen wie die Sklerodermie, der systemische Lupus erythematodes und die rheumatoide Arthritis statistisch überzufällig häufig bei Silikosepatienten gefunden.

## **1.5. Vorstellungen zur Pathogenese der Pneumokoniosen**

Die Silikose ist die am besten untersuchte Pneumokoniose. Trotz intensiver Forschung sind allerdings immer noch nicht alle pathogenetischen Prinzipien erkannt worden. Es ist zur Zeit unklar, ob von den heutzutage eingesetzten Materialien wie z.B. Keramik, Steinwolle, Glaswolle und Titandioxid ebenfalls eine biologische Gefährdung ausgeht. Da man annimmt, daß Erkrankungen, die durch diese Materialien ausgelöst werden, ähnlich verlaufen könnten, wie die der Silikose, soll hier die Pathogenese der Silikose als Modellerkrankung exemplarisch erläutert werden.

### **1.5.1. Alveolarstaub und Translokation der Partikel**

Um eine Pneumokoniose verursachen zu können, müssen Fasern bzw. Partikel eine bestimmte Größe aufweisen, damit diese bis in den Alveolarraum vordringen können. Größere Fasern bleiben bereits an den mechanischen Barrieren des Mundes bzw. der Nase und an den Schleimbarrieren des Tracheobronchialsystems hängen und werden über den mukoziliären Apparat wieder nach außen transportiert. Der Teil der Substanzen, der diesem mechanischen Sieb entgeht, bildet den sog. Alveolarstaub (Faserlänge zwischen 3 und 11  $\mu\text{m}$ ). Dieser wird allerdings größtenteils wieder über die Ausatemluft abgegeben, so daß nur ein Bruchteil des Staubs in die Lunge gelangt und dort persistiert.

Der Weg, den Siliziumdioxidpartikel in vivo zurücklegen, stellt sich im Tierversuch wie folgt dar: Bei Ratten, die Siliziumdioxidstäuben ausgesetzt waren, zeigte sich schon nach kurzer Expositionsdauer eine Ansammlung der Partikel in den Alveolargängen distal der terminalen Bronchiolen der Lunge und

in den Alveolarmakrophagen (Brody et al. 1982). Nach 24 Stunden war das Material fast ausschließlich intrazellulär in Makrophagen und Typ-I-Pneumozyten lokalisiert. Auch fand man im Interstitium Siliziumdioxidpartikel, entweder als Inhalt der Phagolysosomen der Makrophagen oder in freier, nicht zellgebundener Form. Für letztere postulierte Lauweryns et al. (1978) eine direkte Passage durch das Alveolarepithel.

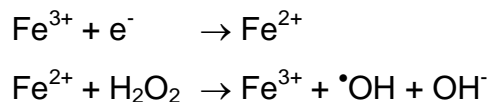
Interessanterweise konnte Absher et al. (1989) im Tiermodell einen biphasischen Verlauf der Entzündung beschreiben. Erklärbar wird dieser durch Translokationsprozesse, denen die Partikel nach der Inhalation in der Lunge unterliegen. Nach der Aufnahme der Partikel in die Lunge werden diese z.T. wieder nach außen transportiert. Hemenway et al. (1990) untersuchten die „Clearance“ der Lunge für Siliziumdioxidpartikel und zeigten, daß die Partikelzahl nach 4 Wochen auf ein Minimum abgefallen war. Es kam zur Akkumulation von Siliziumdioxid in den lymphatischen Geweben, die mit der Lunge assoziiert waren (Absher et al. 1992). Es wurde ein ständiger Austausch der Partikel zwischen den alveolären Zellen, dem Lungengewebe, dem perivaskulären und peribronchialen Lymphgefäßen und dem lymphatischen Gewebe postuliert. Auch wurden in der Milz, Niere, Leber und Blut geringe Mengen Siliziumdioxid nachgewiesen.

### **1.5.2. Wirkung der Siliziumdioxidpartikel auf die Lunge**

Wie kommt es nach der Deposition von Partikeln zur Entzündungsreaktion und schließlich zu den typischen Veränderungen, wie man sie bei der chronischen Silikose findet? Drei verschiedene Mechanismen sind zunächst ursächlich für die Schädigung des Lungengewebes: (1) der *direkte Kontakt* der Partikel mit dem Lungenparenchym bzw. mit den autochtonen Zellen. (2) Einwanderung nicht-ortsständiger Zellen im Rahmen der Entzündungsreaktion. (3) Aktivierung von *Makrophagen* und Freisetzung toxischer Metabolite (Davis 1996).

Partikel aus Siliziumdioxid sind für einige Zellpopulationen zytotoxisch. Die biologische Wirksamkeit der Partikel läßt sich allerdings *nicht*, wie lange Zeit angenommen, mit der mechanischen Alteration der Zellmembranen durch scharfe Kanten des kristallinen Siliziumdioxids erklären, denn sowohl

Diamantenstaub als auch amorphes Siliziumdioxid weisen ebenfalls scharfe Kanten auf, ohne selbst zytotoxisch zu sein. Es gibt jedoch viele Hinweise, daß die chemische Beschaffenheit der Kristalle eine ganz entscheidende Rolle bei der Zytotoxizität spielt. Bagchi (1992) beschreibt die Wasserstofffreisetzung durch polymerisierte Kieselsäure und/oder die Reaktion von Silanol-Gruppen (SiOH) mit biologischen Membranen. Allerdings reichen diese Modelle nicht aus, um die Toxizität dieses Materials vollständig zu erklären. Neuerdings gilt deshalb den sogenannten freien Radikalen ein besonderes Augenmerk. An Silanol-Gruppen komplex gebundenes Eisen kann mittels der Fenton-Reaktion Hydroxylradikale bilden (Ghio et al 1990).



Solche Radikale können nun mit biologischen Membranen in Wechselwirkung treten (z.B. Oxidation von Lipidbestandteilen der Zellmembranen) und somit zu irreversiblen Zellschäden führen.

Interessanterweise konnte man feststellen, daß es einen Unterschied zwischen „frisch“ gemahlenen und bereits „gealterten“ Siliziumdioxidpartikeln gibt. Vallyathan et al. (1988) konnten zeigen, daß frisch gewonnene Materialien vermehrt Hydroxylradikale bildeten und damit gleichzeitig eine ausgeprägtere Zytotoxizität besaßen.

Die Bedeutsamkeit der Radikalbildung läßt sich auch an der gesteigerten Expression sogenannter defensiver Systeme wie Katalase, Glutathion, Peroxidase und Superoxiddismutase in der Lunge nachweisen. Insbesondere für die letzten beiden Enzyme konnte gezeigt werden, daß sie in vivo, nach Exposition von Ratten mit Siliziumdioxid, vermehrt in Typ II Pneumozyten exprimiert wurden (Holley et al. 1992; Janssen et al. 1992). Allerdings konnte Seo et al. (1999) nachweisen, daß Siliziumdioxid nicht nur über die Bildung von Radikalen zur Hochregulation von Abwehrsystemen führte, sondern auch den Abbau von Peroxidasen zur Folge hatte. Somit kann Siliziumdioxid die Schutzmechanismen der Lunge auch direkt hemmen.

Wenn Partikel aus Siliziumdioxid in die Lunge gelangen, so kommt es zum direkten Kontakt mit Typ-I-Pneumozyten. Für diese Zellen ist Siliziumdioxid zytotoxisch.

Als Folge der Zerstörung der Typ-I-Pneumozyten kommt es zur Hyperplasie und Hypertrophie der Typ-II-Pneumozyten. Man nimmt an, daß diese Zellen als Vorläuferzellen der Typ-I-Pneumozyten fungieren. Gleichzeitig wird durch die Typ-II-Pneumozyten das Surfactant-Protein A produziert und in den Alveolarraum abgegeben, hierdurch kommt es zur Verminderung der Toxizität des Siliziumdioxids (Spech et al. 2000). In vitro Versuche mit Rattenmakrophagen konnten bestätigen, daß nach Zugabe von Surfactant die Toxizität von Siliziumdioxid vermindert wurde (Emerson et al. 1983; Wallace et al. 1985). Möglicherweise kommt es zur Bedeckung der Oberfläche der Partikel mit inertem Protein, wodurch die Fähigkeit Radikale bilden zu können, vermindert wird.

Weiterhin kommen Partikel aus Siliziumdioxid mit gewebeständigen Makrophagen in Berührung. In Abhängigkeit von der Dosis besitzt Siliziumdioxid eine toxische Wirkung auf die Makrophagen bzw. kann die Zellen zur Produktion von zytotoxischen Metaboliten und anderen Mediatoren anregen (s.u.).

In vitro Versuche mit Siliziumdioxid und Makrophagen führten zur Lyse der Makrophagen, während sowohl Latex- als auch Diamantpartikel nicht toxisch waren (Allison et al. 1966). Durch Zugabe von Surfactant konnte dieser Effekt wieder reduziert werden (Emerson et al. 1983; Wallace et al. 1985). Weitere in vitro Versuche zeigten, daß Siliziumdioxid die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen durch Alveolarmakrophagen induzierte, während Titandioxid und Aluminium als Vertreter biologisch inerter Stoffe dazu nicht in der Lage waren (Vallyathan et al. 1992; Nyberg et al. 1990; Gusev et al. 1993). Vallyathan et al. (1988) konnten außerdem beobachten, daß auch hier frisch gewonnene Materialien eine ausgeprägtere Zytotoxizität besaßen und Alveolarmakrophagen zu einer stärkeren Bildung von Sauerstoffradikalen stimulierten. In vivo Studien an Ratten bestätigten diese Beobachtung (Vallyathan et al. 1995).

Eine weitere bedeutsame Zellpopulation für die Pathogenese der Silikose sind die neutrophilen Granulozyten. Man kann diese im Gewebe und auch in der

bronchoalveolären Lavage (BAL) von Siliziumdioxid-exponierten Ratten nachweisen. Sie werden durch Makrophagenprodukte, Bestandteile des Komplementsystems und auch andere chemotaktische Faktoren in die Lunge gelockt (s.u.). Diese rekrutierten und aktivierten Neutrophilen könnten ebenfalls eine wichtige Quelle toxischer Metabolite sein und somit zu weiteren Zellschäden führen (Davis 1996).

### **1.5.3. Entzündung**

Die Rekrutierung, Ansammlung und Aktivierung von Entzündungszellen ist ein typisches Erscheinungsmerkmal der Silikose. Mediatoren in der extrazellulären Flüssigkeit, die durch aktivierte Zellen sezerniert wurden, werden für die Initiation und Progression der Entzündungsvorgänge verantwortlich gemacht. Im Tierversuch kann man zu verschiedenen Zeitpunkten typische Veränderungen der Zellpopulationen in den Lungen nachweisen (s.u.).

Am Anfang der Entzündungskaskade steht die Interaktion der Siliziumdioxidpartikel mit der Flüssigkeit in den Alveolen. Das sich in den Alveolen befindende Komplement kann direkt durch Siliziumdioxid (Callis et al. 1986) gespalten werden, wobei die Komponente C5a abgespalten wird. Diese ist stark chemotaktisch wirksam und lockt sowohl Neutrophile als auch Makrophagen in das Entzündungsgebiet. Diese setzen ihrerseits chemotaktisch wirksame Substanzen frei und unterstützen somit die Rekrutierung weiterer Entzündungszellen.

Im folgenden Abschnitt sollen nun die Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellpopulation in Abhängigkeit von der Krankheitsdauer dargestellt werden, wie sie sich intraalveolär, interstitiell und auch im Lymphknoten abspielen.

Nach der Exposition von Ratten mit Quarzstaub zeigte sich in der bronchoalveolären Lavage (BAL) folgendes Bild: Während sich in den BAL der Kontrolltiere fast ausschließlich Makrophagen (97%) und nur einige Lymphozyten (2%) sowie Neutrophile (1%) fanden (Davis et al. 1981), konnte man sofort nach der Quarzexposition einen Influx von Neutrophilen beobachten. Nach 2-3 Wochen zeigte sich innerhalb der Luftwege wieder ein normales Zellbild. Anschließend folgte eine zweite Entzündungsphase, in der alle drei



Zelltypen um das 10 bis 100-fache anstiegen, die relativen Proportionen aber gleich blieben (Driscoll et al. 1990).

Um auch Veränderungen erfassen zu können, die sich interstitiell abspielen, d.h. durch die BAL nicht erfaßt werden, untersuchte man die Lungen von Ratten vier Monate nach Quarzexposition und verglich diese mit Kontrolltieren. Im digestierten Lungenparenchym war der Anteil mononukleärer Zellen der Kontrolltiere 16 %  $CD4^+$ , 6 %  $CD8^+$ , 3 %  $\gamma\delta$   $TCR^+ CD4^- CD8^-$ ; 15 % NK-Zellen, 6 % B-Zellen und 12 % Makrophagen. In den Lungen Quarz-exponierter Tiere kam es zum 1,7-fachen Anstieg der Zellzahl, wobei die Relation der einzelnen Fraktionen wiederum gleich blieb (Davis et al., 2000).

Bei der Untersuchung der drainierenden thorakalen Lymphknoten der Ratte ein Jahr post expositionem zeigte sich ein Anstieg des Gewichts der Lymphknoten um das 35-fache. Dieser Anstieg war durch die Zunahme mononukleärer Zellen verursacht (Garn et al. 1997). 2 Wochen nach Exposition kam es zur Einwanderung von  $CD4^+$ -Zellen. Nach 6 Wochen waren vornehmlich B-Zellen für die Vergrößerung der Lymphknoten verantwortlich. Der typische Lymphknotenaufbau mit Keimzentren und T-Zell-Regionen löste sich auf. Makrophagen, teilweise mit Siliziumdioxid beladen, bildeten granulomartige Strukturen. Nach 52 Wochen fand man nur noch mit Granulomen durchsetzte Lymphknoten ohne Fibrose. Das Verhältnis T- zu B-Zellen entsprach wieder dem der Kontrollen (Friedetzky et al. 1998).

Eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Silikose spielen nach heutigem Verständnis Makrophagen. Insbesondere durch die Sekretion von Mediatoren und zytotoxischen Substanzen sind sie an der Initiation und Aufrechterhaltung der Entzündungsvorgänge beteiligt. Bei der Untersuchung von Makrophagen, die man aus Siliziumdioxid-exponierten Tieren gewonnen hatte, zeigten diese verschiedene Marker einer gesteigerten Aktivierung. Zum einen wiesen sie morphologische Veränderungen im Sinne einer Ausbreitung und Kräuselung der Membranen auf. Zum anderen zeigten sie eine gesteigerte Phagozytose von inerten Partikeln bzw. Bakterien; der Verbrauch von Sauerstoff nahm ebenfalls zu (Davis et al. 1981). Außerdem wurde eine vermehrte Expression von MHC-II-Molekülen beobachtet (Struhar et al. 1989). Residente oder rekrutierte Makrophagen wurden direkt durch Siliziumdioxid-Partikel oder

indirekt durch andere Zellen zur Produktion und Sekretion von Radikalen und Mediatoren stimuliert.

Von diesen spielten vor allem Eicosanoide,  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und Stickstoffmonoxid-Radikale für die Pathogenese der Silikose eine wichtige Rolle.

Ein lokal wirksames immunmodulatorisches System bilden Produkte der Arachidonsäure, die sogenannten Eicosanoide. Diese C-20 Fettsäuren, die aus Phospholipiden der Zellmembranen mittels der Phospholipase A2 herausgelöst werden, können durch das Enzym Cyclooxygenase zu Prostaglandinen bzw. Thromboxanen oder mittels der Lipoxygenase in Leukotriene (LT) überführt werden. Während  $\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$  und  $\text{LTE}_4$  den Tonus glatter Muskulatur der Bronchien und der Gefäße steigern können, weist  $\text{LTB}_4$  ausgeprägte immunmodulatorische Effekte auf. So steigert es die Leukozytenadhärenz an Endothelien (Henderson 1987) und wirkt chemotaktisch auf Neutrophile, Monozyten und Alveolarmakrophagen (Martin et al. 1984). Außerdem steigert  $\text{LTB}_4$  die Freisetzung von  $\text{IL-1}$  und  $\text{TNF-}\alpha$  (Gagnon et al. 1989).

Makrophagen sind maßgeblich an der Bildung von Leukotrienen beteiligt (Peters-Golden et al. 1990; Bigby et al. 1987). Nach in vitro Stimulation von Makrophagen durch Siliziumdioxid zeigten diese eine gesteigerte  $\text{LTB}_4$  Produktion (Dubois et al. 1989; Englen et al. 1989). In vivo Studien ergaben, daß es während der akuten Form der Silikose zu einem Anstieg der Leukotriene kam (Sporn et al. 1990; Sibille et al. 1990). Dies kann erklären, daß es im Verlauf der Silikose zum Anstieg der verschiedenen Zellpopulationen kommt. Im Gegensatz hierzu stellten Mohr et al. (1992) im Rattenmodell fest, daß es bei der chronischen Form der Silikose zu einer gedrosselten Produktion dieser Mediatoren als eine Art Gegenregulation zur gesteigerten Freisetzung von  $\text{TNF-}\alpha$  kommt.

$\text{TNF-}\alpha$  spielt eine wichtige Rolle als Mediator in der Entzündung. Es aktiviert das Endothel, steigert die Permeabilität und den Durchmesser von Gefäßen, fördert die Lymphdrainage und aktiviert die Blutgerinnung, um die Ausbreitung eines Erregers auf dem Blutwege einzudämmen.  $\text{TNF-}\alpha$  fördert insbesondere die Permeabilität des Endothels für Neutrophile und stimuliert deren Migration in das Entzündungsgebiet (Brett et al. 1989; Furie et al. 1989).

Durch Induktion einer Apoptose kann es den Zelltod einiger Tumorzellen auslösen. Als systemische Wirkungen werden Fieber, Schock und Kachexie beschrieben.

In vitro Stimulation von Makrophagen mit Siliziumdioxid in nicht zytotoxischen Dosen führte zu einer vermehrten TNF- $\alpha$  Freisetzung (Dubois et al. 1989; Claudio et al. 1995). Versuche an Alveolarmakrophagen zeigten einen dosisabhängigen Anstieg von TNF- $\alpha$  und NFkappaB durch Siliziumdioxid. Dieser konnte nach Zugabe von Katalase bzw. Deferoxamin verhindert werden, somit scheinen Radikale eine zentrale Stellung für die Induktion von TNF- $\alpha$  zu spielen (Rojanasakul et al. 1999). Makrophagen aus Siliziumdioxid-exponierten Tieren zeigten nach einem in vitro Stimulus (Endotoxin) eine vermehrte TNF- $\alpha$  Produktion, was auf eine Präaktivierung dieser Zellen deutet (Mohr et al. 1991). Davis et al (1998) konnten im Maus-Modell der Silikose TNF- $\alpha$  produzierende mononukleäre Zellen intraalveolär, innerhalb der Läsionen des Parenchyms und verstreut innerhalb des BALT und Lymphknoten nachweisen.

Ein weiteres bedeutsames proinflammatorisches Zytokin ist IL-1. Lokal führt dieser Mediator zur Stimulation von B- und T-Zellen, zur Autoregulation von Monozyten und Makrophagen, sowie zur Stimulation von Fibroblasten. Eine erhöhte Produktion von IL-1 wurde in diversen mit granulomatösen Läsionen einhergehenden Krankheiten der Lunge beschrieben wie z.B. bei der Sarkoidose (Kern et al. 1988). Systemische Wirkungen von IL-1 sind Fieber, Anorexie und Hypotension.

In vitro Stimulation von Makrophagen mit Siliziumdioxid führte zu einer gesteigerten Produktion von IL-1 (Schmidt et al. 1984; Kampschmidt et al. 1986). Makrophagen, die man aus Siliziumdioxid-exponierten Tieren isolierte, zeigten eine spontane Freisetzung von IL-1 (Struhar et al. 1989; Oghiso et al. 1986; Struhar et al. 1989). Mittels in-situ-Hybridisierung fand man IL-1 produzierende mononukleäre Zellen sowohl intraalveolär, innerhalb der Läsionen des Parenchyms als auch verstreut innerhalb des BALT und Lymphknoten (Davis et al. 1998).

In den letzten Jahren gerieten Stickstoffmonoxidradikale (NO) immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses aktueller Forschungen. Für die Bildung von NO

ist die Enzymklasse der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) verantwortlich, die aus der Aminosäure L-Arginin unter Abspaltung von L-Citrullin NO synthetisieren können (Tayeh et al. 1989). Die beiden Isoformen der konstitutiv exprimierten NOS (cNOS) sind Enzyme, die im Endothel und in Neuronen zentraler und peripherer Strukturen konstitutiv exprimiert werden. Diese Formen werden jeweils nur kurzzeitig aktiviert und produzieren NO, das als Neurotransmitter und als Mediator zur Relaxation glatter Muskulatur in Gefäßen dient (EDRF, endothelial derived relaxation factor). Die Aktivierung ist  $\text{Ca}^{++}$ -Calmodulin-abhängig (Forstermann et al. 1990). Die in Makrophagen vorkommende induzierbare Isoform (iNOS) ist  $\text{Ca}^{++}$ -unabhängig, da Calmodulin schon während der Translation an das Enzym fest gebunden wird. Im Gegensatz zu den konstitutiven Formen ist es in der Lage, relativ große Mengen NO zu produzieren. NO werden zytostatische und zytozide Effekte gegen Bakterien, Pilze, Protozoen, Helminthen, Viren und Tumoren zugesprochen (Nathan et al. 1991; MacMicking et al. 1997) und es spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des Schocks. Die wichtigsten Induktoren der iNOS sind LPS,  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  und IL-1. IL-12 ist ebenfalls ein möglicher Induktor der iNOS, wahrscheinlich über die Differenzierung von T-Zellen zu Th1-Zellen, die dann  $\text{IFN-}\gamma$  produzieren (Leonard et al. 1997).

Als Gegenregulator ist das IL-11 beschrieben worden, das über die Suppression von NFkappaB zu einer eingeschränkten Synthese von  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 und NO führt. Auch wird die Leistung von Th1-Zellen,  $\text{IFN-}\gamma$  zu produzieren, eingeschränkt (Schwertschlag et al. 1999). Makrophagen und neutrophile Granulozyten, die man aus Tieren nach Siliziumdioxid-Instillation gewinnen konnte, zeigten eine gesteigerte NO Synthese. In vitro führte die isolierte Exposition von Makrophagen mit Siliziumdioxid nicht zu einer NO-Produktion, während Makrophagen, die mit Flüssigkeit aus den Alveolen stimulierter Ratten inkubiert wurden, sehr wohl NO produzierten (Castranova et al. 1998).

Durch die Sekretion von Zytokinen, insbesondere durch  $\text{IFN-}\gamma$ , sind auch Lymphozyten an der Krankheitsentstehung beteiligt. Man kann bei an Silikose erkrankten Menschen und Tieren eine erhöhte Anzahl von ihnen in Granulomen, Lungengewebe, intrapulmonalem lymphatischem Gewebe und

BALT (s.o.) nachweisen (Davis und Gemsa 1996). Die Zahl der Lymphozyten ist dabei im Interstitium größer als in der BAL (Sjostrand et al. 1991). Die genauere Differenzierung der Lymphozyten ergab, daß es sich hierbei vor allem um aktivierte T-Zellen vom Subtyp  $CD4^+$  und  $CD8^+$  handelte (Absher et al. 1989; Davis et al. 1993; Kumar 1989, Struhar et al. 1989, Kumar et al. 1990). Suzuki et al. (1996) konnten zeigen, daß die Entzündungsreaktion bei der Silikose in athymischen Mäusen schwächer ausfiel als in euthymischen, der Grad der Fibrosierung aber nur unwesentlich verändert war. Dies unterstreicht die Bedeutung der Lymphozyten in der Initiation der Entzündungsreaktion.

Davis et al. (1999) zeigten, daß es bei Mäusen zu einem Anstieg von  $IFN-\gamma$  in silikotischen Granulomen und innerhalb des vergrößerten BALT kam. Es wurde angenommen, daß Th1-Zellen für die  $IFN-\gamma$  Produktion verantwortlich waren und daß diese Zellen somit eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese der Silikose spielen. Da man zusätzlich eine systemische Aktivierung von Makrophagen nachweisen konnte (Mohr et al. 1991), nimmt man an, daß es eine Lymphozytenpopulation geben müsse, die hierfür verantwortlich ist.

In der Phase der chronischen Entzündung zeigte sich im Lymphknoten eine Vermehrung aktivierter T-Lymphozyten vor allem der  $CD8^+$ , weniger ausgeprägt auch der  $CD4^+$  Zellen. Auch war hier die Expression der  $IFN-\gamma$ -mRNA deutlich erhöht (Garn et al. 1997). Garn et al. (2000) konnten zeigen, daß es schon in der frühen Phase (8 Wochen post expositionem) zu einer Th1 dominierten Reaktion in den Lymphknoten kam. Aktivierte Th1-Zellen können über die Produktion von  $IFN-\gamma$  zu einer gesteigerten Aktivierung der Makrophagen beitragen. Winston et al. (1999) beschreiben, daß  $IFN-\gamma$  auch eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen spielt. Die Autoren postulieren, daß eine *zytozide* Subpopulation der Makrophagen entsteht, wenn diese zusätzlich zu  $TNF-\alpha$  mit  $IFN-\gamma$  kostimuliert werden. Kennzeichen der zytoziden Makrophagen ist deren iNOS Expression. Fehlt  $IFN-\gamma$ , so kommt es zu einer IGF-1 (insulin like growth factor) Expression der Makrophagen. Von dieser Subpopulation nimmt man an, daß sie eine wichtige Aufgabe in der Wundheilung übernimmt.

Lymphozyten können über das lymphatische System in die Lunge gelangen. Tatsächlich wurde eine gesteigerte Anzahl aktivierter Lymphozyten in der Lunge bei der Silikose beschrieben (Davis et al. 1999; Kumar 1989; Kumar et

al. 1990). Dort könnten sie ebenfalls durch die Freisetzung von IFN- $\gamma$  an der Aktivierung der Makrophagen und somit an der durch Makrophagen induzierten Fibroblasten-Stimulierung beteiligt sein (Li et al. 1992). Davis et al. (1999) konnten eine Reduzierung der Fibrose in IFN- $\gamma$  knock-out Mäusen zeigen. Desweiteren könnte die gesteigerte Produktion von IFN- $\gamma$  die verminderte Th2-Zell-Reaktion durch Suppression von IL-4 erklären (Morel et al. 1998; Boehm et al. 1997).

Wie es zur Aktivierung von T-Zellen im Rahmen der Silikose kommt, ist noch Gegenstand aktueller Untersuchungen. Verschiedene Mechanismen werden hierbei diskutiert. (1) Mit Siliziumdioxid beladene Makrophagen sezernieren IL-1, TNF- $\alpha$ , Chemokine sowie ETA-1 (Osteopontin) (Nau et al. 1997) und könnten darüber T-Zellen aktivieren. (2) Es kommt zur Interaktion vom CD40-Ligand der T-Zellen und CD40 der Makrophagen, die dann IL-12 produzieren und somit eine Th1-Antwort induzieren (Isler et al. 1999). (3) Die Aktivierung erfolgt über  $\gamma\delta$ -T-Zellen (Ferrick et al. 1995). Generell reichen die unter 1 bis 3 genannten Faktoren nicht aus, um Lymphozyten zu stimulieren, so daß man annimmt, daß aktivierte Lymphozyten aus dem Interstitium, bronchoalveolärem Raum oder aus dem BALT stammen (Pabst 1992), wo Siliziumdioxid die T-Zellen unspezifisch oder über Siliziumdioxid-veränderte Proteine aktiviert.

#### **1.5.4. Fibrose**

Fibroblasten sind mesenchymale Zellen, die für die Synthese der extrazellulären Matrixsubstanzen wie Kollagen und Elastin sowie für deren Abbau zuständig sind. Im Rahmen der Silikose schreibt man ihnen eine wichtige Rolle in der Entstehung von Granulomen und der interstitiellen Fibrose zu.

Bei der Silikose zeigt sich folgendes Bild: Nach der Instillation von Quarz erfolgte ein sofortiger Anstieg der Kollagenproduktion in den Lungen von Ratten (Reiser et al. 1982). Lungengewebe aus Tieren, die an Silikose erkrankt waren, zeigte unter Kulturbedingungen eine andauernde Produktion von Kollagen (Dauber et al. 1980) und im Serum der Tiere wurden Marker eines gesteigerten Kollagenmetabolismus' nachgewiesen (Poole 1985; Poole et al. 1985). In situ

Hybridisierung für Typ-I-Prokollagen mRNA zeigte eine vermehrte Expression im Parenchym (ausschließlich in den granulomatösen Läsionen), in den Luftwegen und Gefäßen der Lunge (Mariani et al. 1996).

Makrophagen scheinen in dem Prozeß der Fibrosierung eine entscheidende Rolle zu spielen (Bowden et al. 1989; Adamson et al. 1991). Die Mechanismen, die schließlich zu einer Fibrosierung der Lunge führen, sind nur teilweise geklärt. PDGF (platelet derived growth factor), IGF-1, IL-1, TNF- $\alpha$ , Fibronectin und TGF- $\beta$  sind mögliche Mediatoren (Davis GS und Gemsa D, 1996). Produkte der Lipoxygenase scheinen ebenfalls wichtig für den Prozeß der Fibrosierung und für die Bildung von Granulomen zu sein, da deren Inhibition sowohl die Bleomycin-induzierte Lungenfibrose (Phan et al. 1986), als auch die Granulombildung durch *Schistosoma mansoni* reduziert (Kunkel et al. 1984).

Daß TNF- $\alpha$  in der Lungenfibrose bei der Silikose eine zentrale Stellung in der Krankheitsentstehung einnimmt, wird durch folgende Beobachtungen unterstützt:

(1) Die Silikose wird durch einen ausgeprägten und lange währenden Anstieg von TNF- $\alpha$  mRNA innerhalb der Lunge begleitet. (2) Die Fibrose kann durch Behandlung mit anti-TNF- $\alpha$ -Antikörpern verhindert und durch rekombinantes TNF- $\alpha$  verstärkt werden. (3) Durch die Infusion von TNF- $\alpha$  können typische Veränderungen bei der Lungenfibrose wie das Wachstum von Fibroblasten, Ablagerungen von Kollagen und Zellnekrose reproduziert werden. (Piguet et al. 1990; Davis et al. 1993; Piguet et al. 1994).

TGF- $\beta$  (transforming growth factor) fördert die Akkumulation von extrazellulärer Matrix durch gesteigerte Synthese von Kollagen, Fibronectin und Protease-Inhibitoren sowie verminderte Synthese von Proteasen. Mit Hilfe der Immunhistochemie gelang die Lokalisation dieses Mediators sowohl in normalen als auch in den Lungen silikotischer Tiere. In den Lungen unbehandelter Kontrolltiere waren nur geringe Mengen von TGF- $\beta$  im Bronchialepithel, in Makrophagen, in glatter Muskulatur der Bronchien und der Gefäße und in den Bronchialdrüsen nachweisbar. In den nodulären Läsionen der Silikose fand man die größte Menge an TGF- $\beta$  in den zentralen hyalinisierten Regionen der Granulome. Peripher waren auch einige Fibroblasten positiv. Bei der akuten Silikose fand man eine ausgeprägte Anfärbung für TGF- $\beta$  der hyperplastischen Typ-II-Pneumozyten und

Makrophagen. In den Läsionen der PMF wurde ebenfalls ein hoher Gehalt an TGF- $\beta$  innerhalb der zentralen Vernarbungen nachgewiesen (Jagirdar et al. 1996).

Huaux et al. (1998) konnten an IL-10 knock-out Mäusen nach Siliziumdioxid-Instillation eine interessante Rolle von IL-10 nachweisen. Während diese Tiere einerseits eine stärkere Entzündungsreaktion zeigten, war der Grad der Fibrosierung weniger ausgeprägt als bei den Kontrolltieren.

Das Wechselspiel der verschiedenen Zellen und Mediatoren ist noch Gegenstand aktueller Forschungsbemühungen. Die genauen Mechanismen, die für die Entstehung der chronischen Form der Silikose von Bedeutung sind, sind größtenteils noch ungeklärt.

## **1.6. Ziel der Arbeit**

Obwohl viele Mechanismen in der Pathogenese der Pneumokoniose noch ungeklärt sind, so ist es unbestritten, daß Makrophagen wesentlich zur Krankheitsentstehung beitragen. Makrophagen sind einerseits an der Translokation der inhalierten Partikel beteiligt und können andererseits an der Gewebeschädigung durch die Produktion von Sauerstoff- und Stickstoff-Radikalen mitwirken. Durch die Produktion von Chemokinen werden weitere Entzündungszellen, besonders neutrophile Granulozyten, in die Lunge gelockt. Von Makrophagen sezerniertes TNF- $\alpha$  und IL-1 sind maßgeblich an der Aktivierung von Lymphozyten und an der Entstehung der Fibrose beteiligt.

Von Silikapartikeln und Asbestfasern sind gesundheitsschädigende Wirkungen seit längerem bekannt und inzwischen auch im Detail gut untersucht. Um diese gesundheitsschädigenden Materialien zu eliminieren, wurde eine Reihe von Ersatzfaserstoffen entwickelt, die heute immer häufiger zum Einsatz kommen. Diese Ersatzfasern, z.B. Glaswolle, Steinwolle und Keramikfasern sind hinsichtlich ihrer gesundheitsschädigenden Wirkungen bisher nur unzureichend charakterisiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einem in vitro System die Wirkung neuerer Ersatzfasern mit denen bekannter Partikel- und Faserpräparationen zu vergleichen. Dazu wurden Makrophagen mit unterschiedlichen Konzentrationen



der verschiedenen Faser- und Partikelpräparationen kultiviert und anschließend die Aktivierung der Zellen untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es, Vorhersagen über gesundheitsschädigende Eigenschaften (z.B. Kapazität der Fibrose-Induktion) der verschiedenen Faserpräparationen zu treffen. Damit könnte dieses Verfahren als erstes schnelles Testsystem Anwendung finden, um die biologische Wirksamkeit neuer Materialien einschätzen zu können.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Isolierung und Kultur von Zellen**

#### **2.1.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen**

##### **2.1.1.1. Zellkulturmedium**

Die Zellkultur erfolgte im Standardmedium RPMI 1640 (Gibco, Karlsruhe), welches durch folgende Supplemente ergänzt wurde:

<b>Supplement</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Hersteller</b>
L-Glutamin 200 mM (100x) .....	2 mM .....	(Gibco)
Natriumpyruvat 100 mM .....	1mM .....	(Biochrom)
HEPES- Pufferlösung 500 mM (100x) .....	5 mM .....	(Biochrom)
Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 U/ml) ....	100 µg/ml .....	(Biochrom)
nicht essentielle Aminosäuren (100x) .....	1 % .....	(Biochrom)
FCS (fötales Kälberserum) .....	10 % .....	(Biochrom)

Im folgenden wird dieses Medium als RPMI<sup>sup</sup> bezeichnet.

##### **2.1.1.2. Kulturbedingungen**

Die Zellkultur erfolgte in einem offenem System in einem Zellkulturschrank Cytoperm (Heraeus, Hanau) unter folgenden Kulturbedingungen:

Temperatur:	37°C
Luftfeuchte:	95%
CO <sub>2</sub> -Gehalt:	5%

#### **2.1.1.3. Bestimmung der Zellzahl**

Alle Zellzählungen wurden in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Dazu wurden jeweils die Zellen in 16 kleinen Quadranten ausgezählt und die Zellzahl in der Zellsuspension anhand folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl im Quadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

Zur Ermittlung der Anzahl lebender Zellen wurden die Zellen zunächst mit Trypanblau gefärbt. Der Anteil vitaler Zellen kann wegen der Eigenschaft des Farbstoffes, sich in toten Zellen anzureichern und diese somit blau zu färben, ermittelt werden. Lebende Zellen sind in der Lage, Trypanblau aktiv aus dem Zytoplasma zu eliminieren, sie werden also nicht gefärbt.

50 µl der jeweiligen Zellsuspension wurden mit dem gleichen Volumen 0,5%-iger Trypanblau-Lösung (Serva, Heidelberg) vermischt. Nach 2 Minuten wurde der Anteil gefärbter Zellen in einer Neubauer Zählkammer ermittelt, dieser lag in den für die Versuche eingesetzten Zellen stets unter 2%.

#### **2.1.1.4. Endotoxinbestimmung mittels LAL-Tests**

Um korrekte Versuchsbedingungen zu gewährleisten, war es notwendig, eine Kontamination der eingesetzten Faser- und Partikelpräparationen durch bakterielles Endotoxin auszuschließen. Eine Verunreinigung würde zu einer direkten Aktivierung der Makrophagenzelllinien führen und damit die Versuchsergebnisse verfälschen.

Alle für die Zellkulturen verwendeten Medien, Seren und Fasern bzw. Partikelsuspensionen wurden mit Hilfe des Limulus-Amöbocyten-Lysat-Tests (LAL) (Whittaker, Walkersville, UK) auf ihren Endotoxingehalt überprüft. Die ermittelten Werte der Endotoxinkonzentration lagen für alle Lösungen stets unterhalb der Nachweisgrenze (<0,1 EU/ml).

## **2.1.2. Makrophagen-Zelllinien NR8383 und R2**

### **2.1.2.1. Allgemeine Beschreibung**

#### **2.1.2.1.1. NR8383-Makrophagen**

Die Alveolarmakrophagen Zelllinie NR8383 wurde aus Zellen der bronchoalveolären Lavage (BAL) einer Sprague Dawley Ratte generiert. Durch permanente Stimulation dieser Zellen mit IL-3 und GM-CSF wurde unter Kulturbedingungen eine autonom proliferierende Zelllinie geschaffen (Helmke et al. 1987). Die NR8383 Zellen wurden durch limitierende Verdünnung kloniert und subkloniert. Diese so gewonnene Zelllinie wies typische Charakteristika von Makrophagen auf (Helmke et al. 1989):

- Phagozytose von Zymosan und *Pseudomonas aeruginosa*
- unspezifische Esterase-Aktivität
- Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche
- „Oxidative Burst“
- Sekretion von IL-1, TNF- $\alpha$  und IL-6
- Replikative Antwort auf exogene Wachstumsfaktoren

#### **2.1.2.1.2. R2-Makrophagen**

Durch Injektion von Siliziumdioxid in die Pleurahöhle einer Ratte konnte J.J. Harvey eine Pleuramakrophagen-Zelllinie entwickeln. Genauere Angaben über die Herkunft der Zellen liegen nicht vor. Die Charakterisierung erfolgte an der William Dunn School of Pathology, Oxford, UK. Brüderle (1997) konnte zeigen, daß R2-Zellen ausdifferenzierten Makrophagen in Morphologie, Antigenexpression und Phagozytosefähigkeit gleichen. Sie exprimieren unabhängig vom Aktivierungszustand der Zellen ED-9, OX41 Antigen, sowie CD11b und CD18.

#### **2.1.2.2. Kultur der Zelllinie**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in sterilen 6-Loch Zellkulturplatten (Falcon

3046) in einem Volumen von 5 ml pro Kavität. Aus den Kulturplatten wurde das Kulturmedium mit suspendierten Zellen abgenommen. Anschließend wurden die Kavitäten mit 4°C kaltem PBS w/o  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  gefüllt und 10 min auf Eis inkubiert. Unter wiederholter Spülung wurden die adhärennten Zellen von der Plattenoberfläche gelöst und zu der bereits vorhandenen Suspension gegeben. Die so erhaltene Suspension wurde unter folgenden Bedingungen zentrifugiert: 10 min; 1000 U/min; 4°C. Diese Bedingungen wurden für alle Waschschrirte von Zellen verwandt.

Anschließend wurde der Überstand dekantiert, das am Boden haftende Pellet wurde in RPMI<sup>sup</sup> aufgenommen und die erforderliche Zellzahl ( $1\text{-}2 \times 10^5$  Zellen/ml) durch entsprechende Verdünnung eingestellt. Alle Arbeiten wurden in einer sterilen Arbeitsbank mit Laminar-Air-Flow-Technik (Heraeus, Hanau) durchgeführt.

Die optimale Zellpassagezeit wurde in Vorversuchen ermittelt. Es ergaben sich durch Ermittlung der Vitalität mittels Trypanblau bzw. MTT und anhand des Farbumschlages des Kulturmediums ein Optimum von 3 Passagen pro Woche.

#### **2.1.2.3. Auftauen und Einfrieren**

Die Ursprungszelllinien wurden unter Standardbedingungen kultiviert und vermehrt. Aliquots der Zellen wurden eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Sie dienten als Ausgangsmaterial für die Versuche.

##### **2.1.2.3.1. Einfrieren**

Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll präpariert. Zum Einfrieren wurden jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen in 1ml vorgekühltem FCS mit 10% (vol/vol) DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck), welches die Wasserkristallbildung beim Einfrieren eindämmen soll, aufgenommen. Anschließend wurde diese Suspension stufenweise auf -80°C heruntergekühlt. Die Lagerung erfolgte dann in flüssigem Stickstoff.

#### **2.1.2.3.2. Auftauen**

Beim Auftauen von Zellen ist prinzipiell zügiges Arbeiten erforderlich. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe von warmem Wasser rasch aufgetaut, die Flüssigkeit in einer 2ml Spritze aspiriert und mit Hilfe einer Kanüle langsam in ein mit RPMI<sup>sup</sup> gefülltes Falconröhrchen getropft. Hierdurch wurde für eine schnelle Ausdünnung des zytotoxisch wirkenden DMSO gesorgt. Anschließend wurden die Zellen in RPMI gewaschen, zentrifugiert und wieder in RPMI<sup>sup</sup> aufgenommen. Die Zellkultur erfolgte nun unter den beschriebenen Bedingungen.

#### **2.1.2.4. Mycoplasmentest**

Zum Ausschluß einer möglichen Mykoplasmenkontamination wurde der Mykoplasma Detection Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim) verwendet. Der Test basiert auf dem Prinzip des Antigennachweises mittels der ELISA-Technik und berücksichtigt die Spezies *M. hyorhina*, *M. arginini*, *A. laidlawii* und *M. orale*. Die Durchführung des Tests erfolgte nach Herstellerangaben. Die Auswertung wurde mit Hilfe eines Plattenphotometers (MR 7000; Dynatech, Denkendorf) durchgeführt.

#### **2.1.2.5. Nitritnachweis**

Für den Einsatz in den Versuchen mußten die Zellen in einem nicht aktivierten Zustand vorliegen. Da die Zellen bereits durch Präparationschritte aktiviert werden können, war es erforderlich, eine durch Präparation bzw. Kultur bedingte Voraktivierung der Zellen auszuschließen. Es zeigte sich, daß voraktivierte Zellen in Gegenwart von 10 U/ml IFN- $\gamma$  signifikante Mengen an NO in das Kulturmedium freisetzen. Deshalb wurde vor Einsatz der Zellen im Versuch die Nitritkonzentration im Kulturmedium nach Behandlung der Zellen mit IFN- $\gamma$  für 24 Stunden mittels Griess-Reaktion (siehe 2.4.3.) analysiert. Die Zellen wurden nur dann in den Versuchen eingesetzt, wenn sie eine minimale spontane NO-Produktion aufwiesen.

### **2.1.3. Isolierung und Kultur primärer humaner Monozyten**

#### **2.1.3.1. Isolation mononukleärer Zellen aus Blut**

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von mononukleären Blutleukozyten wurden frische "buffy coat"-Präparationen aus peripherem Venenblut gesunder Blutspender aus der Abteilung für Transfusionsmedizin im Klinikum der Philipps-Universität Marburg verwendet. „Buffy coats“ entstehen bei der Separation bestimmter Blutzellen (Herstellen von Erythrozyten- oder Thrombozytenkonzentraten) und enthalten neben den Granulozyten auch hochangereichert periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC „peripheral blood mononuclear cells“). Die Präparation der PBMC-Fraktion erfolgte nach der Ficoll-Hypaque-Methode, durch die aufgrund von Dichteunterschieden mononukleäre Zellen von anderen Blutzellen getrennt werden (Boyum 1968). Die PBMC-Fraktion enthält neben Monozyten auch B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen. Die weitere Aufreinigung der Monozyten erfolgte unter Verwendung der Counter Flow-Zentrifugation (Elutriation).

Die Aufarbeitung erfolgte in 50 ml Zentrifugationsröhrchen (Greiner, Nürtingen). 12 ml 25°C warmes Ficoll (Ficoll-Trennlösung, Dichte 1,077 g/ml; Biochrom, Berlin) wurden vorsichtig mit „buffy“-Vollblut überschichtet (Endvolumen 50 ml) und bei 400 x g bei Raumtemperatur für 40 min zentrifugiert. Danach waren die Erythrozyten und Granulozyten als Sediment abgesetzt, die mononukleären Zellen in einer Interphase oberhalb des Ficolls angereichert und die Thrombozyten in dem darüber liegenden Serum ankonzentriert. Um die Ficoll-Lösung sowie restliche Erythrozyten und Thrombozyten zu entfernen, wurde nach Abnahme der oberen Phase die Interphase mit den mononukleären Zellen sorgfältig abpipettiert, mit 4°C kaltem PBS<sup>def</sup> verdünnt und zweimal gewaschen. Zur Durchführung dieser Waschschrte wurden zwei Zentrifugationen bei 4°C mit 300 x g für 7 Minuten durchgeführt. Das Sediment wurde jeweils resuspendiert und auf 50 ml mit kaltem PBS<sup>def</sup> aufgefüllt. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in insgesamt 40 ml RPMI<sup>sup</sup> aufgenommen und direkt im Anschluß elutriert.

### 2.1.3.2. Elutriation von Monozyten

Die Elutriation bietet die Möglichkeit, Zellen aufgrund ihrer Größe und Dichte zu trennen. Dies wird möglich durch die Erzeugung zweier entgegengesetzt wirkender Kräfte. Durch die Rotation der Zentrifuge wird eine Sedimentationskraft hervorgerufen (Zentrifugalkraft), der ein von einer Pumpe erzeugter, kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom in entgegengesetzter Richtung entgegenwirkt (Zentripetalkraft).

Jede Zelle in der Separationskammer wandert dadurch in eine Zone, in der ein Gleichgewicht zwischen ihrer Sedimentationsrate und der durch die Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums erzeugten Zentripetalkraft herrscht. Innerhalb der Separationskammer wird durch ihre spezielle Geometrie ein Fließgeschwindigkeitsgradient erzeugt. Hierdurch wird es möglich, Zellen mit verschiedenen Sedimentationsraten in Suspension zu halten. Durch die schrittweise Erhöhung der Flüssigkeitsrate und der dadurch hervorgerufenen Steigerung der Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums oder durch die Verringerung der Rotordrehzahl können nach und nach relativ homogene Zellseparationen aus der Kammer ausgespült werden. Jede folgende Separation besteht aus größeren Zellen als die vorhergehende Fraktion.

Zwischen Flüssigkeitsrate und Rotordrehzahl besteht folgender Zusammenhang (Beckmann, Instruction Manual):

$$F = X \times D^2 \times (\text{RPM} \times 10^{-3})^2$$

F = Flüssigkeitsrate in ml/min

X = Kammerfaktor: 0,0511

D = Zelldurchmesser in mm

RPM = Rotorumdrehungen pro Minute

Bei Verwendung einer konstanten Rotordrehzahl ist es mit Hilfe dieser Formel möglich, die Größe der Zellen zu berechnen, die bei einer bestimmten Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums aus der Kammer ausgespült werden.

Für die Elutriationsversuche wurde das JE-6B Elutrationssystem mit



dazugehörigem Rotor und der Standardseparationskammer verwendet. Die Standardkammer besitzt ein Volumen von 4,2 ml.

Die Durchführung der Elutriation erfolgte mit der konstanten Rotorgeschwindigkeit von 3000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C. Zum Separieren der Zellen wurde die Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums schrittweise erhöht. Als Elutriationsmedium wurde PBS<sup>def</sup> + 0,1% BSA + 0,01% EDTA verwendet. Pro Elutriationsschritt wurden 300-500 x 10<sup>6</sup> PBMCs eingesetzt.

Für die Aufreinigung der Monozyten wurde die aus „buffy coats“ durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnene PBMC-Fraktion in 45 ml RPMI<sup>sup</sup> aufgenommen und mit einer Pumpleistung von 7 ml/min in die Separationskammer eingezogen. Im Anschluß wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 15 ml/min für 5 min gespült, um restliche Thrombozyten und Erythrozyten zu entfernen. Durch die schrittweise Erhöhung der Fließgeschwindigkeit bis zu einer Pumpleistung auf 36 ml/min wurde die Monozytenfraktion in 100 ml Elutriationsmedium separiert. Die elutrierten Zellfraktionen wurden bei 350 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, das Sediment resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

#### **2.1.3.3. Adhärenz**

Die Zellsuspension wurde auf 1,5 Zellen/ml mit hRPMI<sup>sup</sup> eingestellt (anstelle von FCS wurde hier 5% humanes AB-Serum verwandt). Die Zellen wurden in die Vertiefungen einer 24-Loch-Platte (Falcon® Primaria; Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) pipettiert. Nach 1-2 Stunden wurden die Überstände abgenommen und es erfolgte ein Waschschrift mit warmem PBS w Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>. Somit wurde der Reinheitsgrad der Monozyten, die eine besondere Haftung auf den Kulturplatten aufweisen, noch erhöht, da nichtadhärente Zellen abgespült wurden. Anschließend wurden die Kavitäten wieder mit 1 ml hRPMI<sup>sup</sup> pro Loch gefüllt und die Zellen für 24 Stunden unter Standardkulturbedingungen inkubiert, um eine mögliche präparationsbedingte Aktivierung abklingen zu lassen.

## **2.2. In-vitro-Stimulation von Zellen**

### **2.2.1. Stimulation mit LPS und IFN- $\gamma$**

#### **2.2.1.1. Stimulation von NR8383- und R2-Makrophagen**

Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll präpariert. Nach dem Einstellen der Konzentration auf  $8 \times 10^5$  Zellen/ml in RPMI<sup>sup</sup> wurden diese in 96-Loch-Platten (Greiner, Frickenhausen) pipettiert (100  $\mu$ l/Loch) und unter Standardbedingungen über Nacht inkubiert.

Zur Charakterisierung der Makrophagenzelllinien R2 und NR8383 war es notwendig, diese auf für Zellen des Immunsystems typische Syntheseprodukte hin zu untersuchen. Dazu wurden die Zellen mit IFN- $\gamma$  (rekombinantes Ratten Interferon- $\gamma$ , HyCult Biotechnology), welches eine biologische Aktivität von  $1 \times 10^6$  U/ml aufwies und LPS (Lipopolysaccharid) aus E. coli Serotyp 0127 (Difco Laboratories, Detroit, USA) stimuliert.

Nach folgendem Schema erfolgte die Stimulation. Das Endvolumen betrug 200  $\mu$ l/Loch. Dafür wurden jeweils 50  $\mu$ l der entsprechenden Lösungen addiert. Die Zellen wurden zum einen mit einer ansteigenden Konzentration von LPS (1, 10 und 100 ng/ml pro Kavität), zum anderen mit einer ansteigenden Konzentration von IFN- $\gamma$  (1, 10 und 100 U/ml pro Kavität) inkubiert. In einem dritten Ansatz wurden Zellen mit einer Kombination aus LPS (1, 10, 100 ng/ml) und IFN- $\gamma$  (1, 10, 100 U/ml) in allen Variationsmöglichkeiten stimuliert. Als Negativkontrolle wurde PBS w/o Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> eingesetzt.

Es folgte nun eine Inkubation für 24 Stunden unter den üblichen Bedingungen. Anschließend wurden die Kulturüberstände gewonnen.

#### **2.2.1.2. Stimulation humaner Monozyten**

Die Stimulation humaner Monozyten erfolgte in Analogie zu den Experimenten mit Makrophagenzelllinien der Ratte, wobei rekombinantes humanes Interferon in den entsprechenden Konzentrationen zur Anwendung kam. Die Kulturüberstände wurden nach den beschriebenen Methoden gewonnen und analysiert.

## **2.2.2. Stimulation mit Fasern und Partikeln**

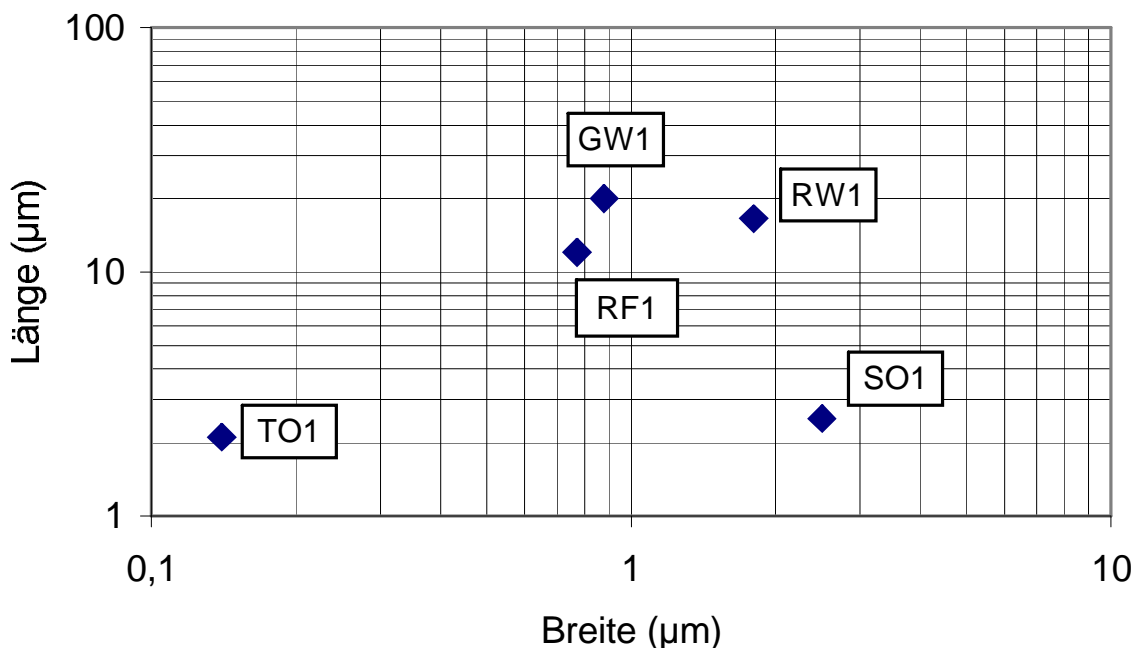
### **2.2.2.1. Herstellung steriler Faser- und Partikelpräparationen**

Um mit anderen Arbeiten vergleichbare Ergebnisse zu erlangen, wurden in der vorliegenden Arbeit, mit Ausnahme von  $\alpha$ -Christobalit, Fasern der JFMRA (Japan Fibrous Materials Research Association) verwandt, welche in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften bereits genau beschrieben waren (siehe Tabelle 3) Das  $\alpha$ -Christobalit wurde freundlicherweise von Dr. G.S. Davis (University of Vermont, Burlington, VT, USA) zur Verfügung gestellt. Die kommerziell erworbenen Fasern wurden nach einer speziellen, größen-spezifischen Press-Methode hergestellt (Kohyama et al. 1997), die Größenrelationen der Partikel und Fasern sind in Tabelle 4 logarithmisch dargestellt.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Faser- und Partikelpräparationen

<b>Nr.</b>	<b>Faser-/Partikelpräparation</b>	<b>Kurzbezeichnung</b>
I	Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ )	TO1
II	$\alpha$ -Christobalit (Siliziumdioxid $\text{SiO}_2$ )	SO1
III	Keramikfasern	RF1
IV	Glaswolle	GW1
V	Steinwolle	RW1
VI	Asbest (Chrysotile)	CR1

Tabelle 4: Logarithmische Auftragung der Länge und der Breite der eingesetzten Fasern/Partikel. Modifiziert nach Kohyama et al. (1997)



Die Aufbereitung der Suspensionen erfolgte unter sterilen Bedingungen. 100 mg der jeweiligen Faser wurden in 10 ml PBS w  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  aufgenommen. Um vorhandene Makro- und Mikroaggregate zu lösen, wurden diese Suspensionen für 60 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Die Suspensionen wurden anschließend bei 121°C für 30 min autoklaviert, um sterile Verhältnisse zu gewährleisten. Die Suspensionen wurden für 15 min bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Fasern/Partikel wurden wieder in PBS w  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  aufgenommen und es folgte erneut eine Ultraschallbehandlung. Diese Schritte wurden nochmals wiederholt. Der nach dem letzten Waschen dekantierte Überstand wurde aufgefangen und diente als Negativkontrolle. Diese Kontrolle wurde verwandt, um zu prüfen, ob bereits gelöste Anteile von Fasern/Partikeln bzw. andere gelöste Faktoren (Endotoxine etc.) einen aktivierenden Effekt auf die Makrophagen ausüben. Dieser Überstand wurde auf seinen Endotoxingehalt hin überprüft (LAL-Test, siehe 2.1.1.4.). In den verwandten Faserpräparationen ließ sich kein Endotoxin nachweisen.

#### **2.2.2.2. Stimulation von Zellen mit Fasern und Partikeln**

Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll präpariert. Nach dem Einstellen der Konzentration auf  $8 \times 10^5$  Zellen/ml in RPMI<sup>sup</sup> wurden diese in 96-Loch-Platten (Greiner, Frickenhausen) pipettiert (100 µl/Loch). Die Zellen wurden unter Standardbedingungen über Nacht inkubiert.

Die eingesetzten Fasern/Partikel wurden in verschiedenen Konzentrationen (Masse/cm<sup>2</sup>) in den Versuchen eingesetzt. Diese Variante wurde gewählt, da Fasern und Partikel aufgrund der Schwerkraft auf den Boden der Platten sinken und somit das Volumen des Mediums im Zellkulturloch für die Interaktion von Zellen mit Fasern/Partikeln nur von untergeordneter Bedeutung ist.

In Vorversuchen wurde mit Hilfe des MTT- und des LDH-Tests ermittelt, welche Dosierungen eingesetzt werden können, ohne daß ein toxischer Schaden in den Zellen induziert wird. Dazu wurden die Präparationen in Konzentrationen von 200 µg/cm<sup>2</sup> bis 1,85 µg/cm<sup>2</sup> eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte in RPMI<sup>sup</sup>. Die Zellen wurden für 24 Stunden unter o.g. Bedingungen inkubiert.

Für alle weiteren Versuche wurden dann Endkonzentrationen von 2, 10 und 50 µg/cm<sup>2</sup> Fasern/Partikel eingesetzt. Die Stimulation der Zellen erfolgte in Abwesenheit und in Gegenwart von 10 U/ml IFN-γ. Nach 24 h Kultur wurden die Überstände abgenommen und analysiert.

#### **2.2.2.3. Stimulation von Zellen mit identischer Faser- und Partikelzahl**

Dieser Versuchsansatz wurde gewählt, da die verschiedenen Fasern und Partikel deutliche Unterschiede in Größe und Form aufwiesen (siehe Abb.1). Daraus folgt, daß die Bedeckung der Zellkulturgefäße bei gleicher Masse pro Fläche sehr unterschiedlich ausfiel.

In einer Neubauer Zählkammer wurden die Faser/Partikel-Konzentrationen in der Suspension ermittelt. Gezählt wurden klar voneinander abgrenzbare Fasern/Partikel (pE=kleinste phagozytierbare Einheit). Auf Grund der Struktur von Chrysotile war es nicht möglich, für diese Substanz eine Faserzahl zu ermitteln. Folglich konnte Asbest in diesem Ansatz nicht untersucht werden.

Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll präpariert. Nach dem Einstellen der Konzentration auf  $8 \times 10^5$  Zellen/ml in RPMI<sup>sup</sup> wurden diese in 96-Loch-

Platten (Greiner, Frickenhausen) pipettiert (100 µl/Loch). Die Zellen wurden unter Standardbedingungen über Nacht inkubiert.

Die eingesetzte Konzentration der Fasern/Partikel betrug  $1,3 \times 10^6$  pE/cm<sup>2</sup>. Die Stimulation der Zellen erfolgte in Abwesenheit und in Gegenwart von 10 U/ml IFN- $\gamma$ .

### **2.2.3. Inkubation sowie Gewinnung der Zellkulturüberstände**

Nach der Stimulation der Makrophagen mit den Substanzen folgte die Inkubation unter Standardbedingungen für 24 Stunden. Im Anschluß wurden die 96-Loch-Platten bei 350 g für 8 min bei 4°C zentrifugiert und auf Eis gelagert. Jeweils 3 x 50 µl zellfreien Kulturüberstands wurden für spätere Analysen in 96-Loch-Platten pipettiert. Während der Probengewinnung wurden die Platten auf Eis gelagert und anschließend mit Folie verschlossen und bei -80°C eingefroren.

## **2.3. Nachweismethoden**

### **2.3.1. MTT-Test**

Das Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) wird in lebenden Zellen durch die enzymatischen Aktivitäten mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem dunkelblauen, wasserunlöslichen Formazanderivat reduziert. Die Menge an gebildetem Farbstoff korreliert daher mit der Anzahl der Zellen und mit deren Stoffwechselaktivität. Der MTT-Test wurde deshalb zur Bestimmung von zytotoxischen Einflüssen auf die Stoffwechselaktivität der entsprechenden Zielzellen eingesetzt. Dieser nach Garn et al. (1993) modifizierte MTT-Test wurde gewählt, um die Einflüsse von LPS, IFN- $\gamma$  und den eingesetzten Fasern und Partikeln auf die Stoffwechselaktivität der entsprechenden Zielzellen nachzuweisen. Die Gebrauchslösungen wurden wie folgt hergestellt: 50 mg MTT wurden in 10 ml PBS gelöst und anschließend steril filtriert (Sterilfilter 0,22 µm). Für SDS-DMF wurden 50 ml DMF (Dimethylformamid, Merck, Darmstadt) mit 50 ml Aqua dest. im Glasgefäß gemischt. Anschließend wurde 20 g SDS (Natriumdodecylsulfat, Serva, Heidelberg) in diesen 100 ml gelöst. Mittels Salzsäure wurde der pH-

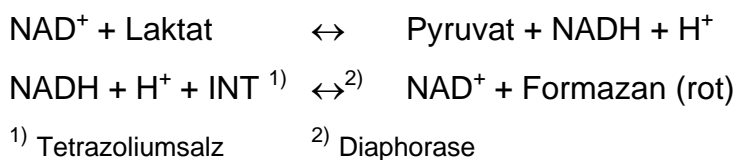
Wert auf 4,2 eingestellt.

Wie bereits beschrieben, erfolgte die Kultivierung der Zellen in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit den verschiedenen Stimuli (s.o.). Die Kulturüberstände der Zellen wurden abgenommen (siehe 2.2.3.) und die Vertiefungen wieder mit 100 µl RPMI<sup>sup</sup> aufgefüllt. Anschließend wurden 10 µl sterile MTT-Lösung hinzugefügt.

Anschließend wurden die Zellen bei 37°C unter Standardbedingungen inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Umsetzung des MTT in das wasserunlösliche Formazanprodukt. Nach 4 Stunden wurden 100 µl SDS-DMF-Lösung zugegeben, um die Zellen zu lysieren und den Farbstoff zu lösen. Nach 14 Stunden Inkubation unter Standardbedingungen erfolgte die Auswertung durch photometrische Messung bei 570 nm gegen 630 nm (Referenzwellenlänge) in einem Mikrotiterplattenphotometer.

### **2.3.2. LDH-Test**

LDH ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches in allen Zellen vorkommt und dort die Umwandlung von Milchsäure zu Brenztraubensäure katalysiert. Bei einer Verletzung der Membranintegrität wird dieses Enzym in das umgebende Medium freigesetzt. Aus diesem Grund kann mittels der Bestimmung der Menge an LDH im Kulturmedium die Vitalität der Zellen analysiert werden. Zum Nachweis der LDH wurde folgende chemische Reaktion eingesetzt, mit der die LDH-Gesamtaktivität unabhängig von der Isoenzymkonstellation gemessen werden kann:



Für die Durchführung des Tests wurde der kommerziell erhältliche CytoTox 96®-Test (Promega; Madison, USA) benutzt, welcher nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Jeweils 50 µl der Probe wurden mit 50 µl des in einem Probenpuffer gelösten Substrates für 30 min im Dunkeln inkubiert. Mit einer Stop-Lösung wurde die Reaktion beendet und anschließend

die Menge an gebildetem Farbstoff durch photometrische Messung bei 490 nm ermittelt. Als Maximalwert (100 % lysierte Zellen) wurde ein aus dem selben Ansatz benutztes Aliquot eingesetzt, in dem die Zellen durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen vollständig lysiert wurden. Diese Probe enthielt somit die LDH-Gesamtmenge aller Zellen. Die entsprechenden Meßwerte wurden hierzu in Relation gesetzt. Als Negativkontrolle diente RPMI<sup>sup</sup>, um den Einfluß des Mediumbestandteils Phenolrot zu ermitteln und rechnerisch zu eliminieren.

### **2.3.3. Nachweis von NO mittels Griess-Reaktion**

Die Produktion reaktiver Stickstoffradikale durch das Enzym iNOS (induzierbare NO-Synthase) stellt eine wesentliche Effektorfunktion aktivierter Makrophagen dar. Die reaktiven Nitroxylradikale reagieren sehr schnell zu Nitrit und Nitrat. Mit der nach ihrem Erstbeschreiber benannten Reaktion läßt sich Nitrit in Lösungen quantifizieren.

Bei einem niedrigem pH entsteht durch die Reaktion von Nitrit mit Sulfanilamid ein Diazonium-Salz. Dieses bindet in einer zweiten Reaktion an ein heterozyklisches Amin (N-[1-Naphthyl]ethylendiamin) und es entsteht eine rote Verbindung. Das Reaktionsprodukt kann photometrisch bei 550 nm gegen 630 nm als Referenzwellenlänge gemessen werden.

Für die Griess-Reaktion wurden 2 Ausgangslösungen hergestellt: Lösung A bestand aus 0,05 g Naphtylethylendiamin in 50 ml Aqua dest. Lösung B enthielt 0,5 g Sulfanilamid in 2,5 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und 47,0 ml Aqua dest.

Kurz vor Gebrauch wurden gleiche Mengen beider Lösungen miteinander vermischt. 50 µl der zu analysierenden Überstände wurden mit 50 µl des Griess-Reagenz für 15 min inkubiert. Als Eichreihe wurde eine Verdünnungsreihe von 100 µM bis 0,05 µM Nitrit benutzt. Anschließend erfolgte die photometrische Auswertung.

### **2.3.4. Nachweis von Zytokinen mittels ELISA**

Die verwendeten ELISA-Systeme wurden auf dem Prinzip der Sandwich-Technik entwickelt. Hierzu wird ein Antikörper, der gegen eine zu testende Substanz gerichtet ist, über eine unspezifische Wechselwirkung an die



Oberfläche von Mikrotiterplatten gekoppelt. Anschließend wird die Probe mit den zu detektierenden Antigenen (Ag) zugegeben. Das Antigen bindet konzentrationsabhängig an den Beschichtungs-Antikörper. Ein zweiter Antikörper reagiert mit einer anderen Antigen determinanten des an den ersten Antikörper gebundenen Ag (Sandwich-Komplex). Ist dieser 2. Antikörper direkt biotinyliert, so kann in einer folgenden Reaktion ein Streptavidin-Peroxidase(POD)-Komplex angelagert werden. Andernfall wird ein POD-markierter Antikörper eingesetzt, der gegen den Isotyp des 2. Antikörpers gerichtet ist. Als Substrat für die Peroxidase dient o-Phenylendiamindihydrochlorid (OPD). Die durch das Enzym umgesetzte Substratmenge ist direkt proportional zu der in der Probe enthaltenen Antigenmenge.

Die Beschichtung der 96-Loch Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc, Wiesbaden) erfolgte mit 50 µl des ersten Antikörpers (Capture-Antikörper) in entsprechender Verdünnung in Beschichtungspuffer (0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 9,0 oder 6,0) bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer (PBS<sup>def</sup> + 0,05% Tween 20) gewaschen (Waschgerät der Firma Dynatech, Denkendorf) und mit 250 µl Blockpuffer (PBS<sup>def</sup> + 0,05% Tween 20) pro Vertiefung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Plattenoberfläche zu blockieren. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Proben bzw. die Standards pipettiert (je 50 µl). Als Standard diente eine Eichreihe des jeweiligen rekombinanten Proteins in RPMI<sup>sup</sup>. Die Negativkontrolle war RPMI<sup>sup</sup>. Es folgte eine 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur. Nicht gebundenes Probenmaterial wurde durch dreimaliges Waschen entfernt. Anschließend wurden je Vertiefung 50 µl des 2. Antikörpers (Detektions-Antikörper) zugefügt und es folgte eine einstündige Inkubation. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen der Platten entfernt. Danach wurden 100 µl des mit Blockpuffer (s.o.) 1:10000 verdünnten Streptavidin-POD-Konjugats pro Vertiefung pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte der Start der Enzymreaktion durch Zugabe des Peroxidase-Substrats.

Die auftretende Farbreaktion wurde nach 5-10 Minuten durch Zugabe von 50 µl 2,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt) gestoppt. Anschließend wurde die Absorption im Mikroplattenphotometer bei 490 nm gemessen. Die Konzentrationen in der

Probe wurden dann durch Vergleich mit der Standardreihe mit Hilfe eines Auswertungsprogrammes berechnet (Biolinx 2.10, Dynatech Laboratories, Inc.).

#### **2.3.4.1. Nachweis von Rattenzytokinen**

##### **TNF- $\alpha$**

1. Antikörper: Hamster anti-TNF- $\alpha$  (0,1 mg/ml)  
Verdünnung 1:400 in Beschichtungspuffer pH 6,0  
Pharmingen, San Diego, USA
2. Antikörper: Kaninchen anti-TNF- $\alpha$ -Biotin markiert (0,5 mg/ml)  
Verdünnung 1:250 in Blockpuffer  
Pharmingen, San Diego, USA
- Standard : Rekombinantes Ratten TNF- $\alpha$   
Konzentrationsbereich 20 ng/ml - 0,02 ng/ml  
Pharmingen, San Diego, USA

##### **MCP-1**

1. Antikörper: Maus anti-Ratte MCP-1 (0,5 mg/ml)  
Verdünnung 1:200 in Beschichtungspuffer pH 9,0  
Pharmingen, San Diego, USA
2. Antikörper: Maus anti-Ratte MCP-1 biotinyliert (0,5 mg/ml)  
Verdünnung 1:250 in Blockpuffer  
Pharmingen, San Diego, USA
- Standard : Rekombinantes Ratten MCP-1 (50  $\mu$ g/ml)  
Konzentrationsbereich 20 ng/ml - 0,02 ng/ml  
Pharmingen, San Diego, USA

##### **IL-1 $\beta$**

1. Antikörper: Maus anti IL-1 $\beta$  (0,5 mg/ml)  
Verdünnung 1:500 in Beschichtungspuffer pH 9,0  
R&D Systems, Wiesbaden

2. Antikörper: Ziege anti-Ratten IL-1 $\beta$  biotinyliert (250 $\mu$ g/ml)  
 Verdünnung 1:250 in Blockpuffer  
 R&D Systems, Wiesbaden
- Standard : Rekombinantes Ratten IL-1 $\beta$   
 Konzentrationsbereich 10 ng/ml - 0,01 ng/ml  
 PAN-Systems GmbH, Nürnberg

#### **2.3.4.2. Nachweis humaner Zytokine**

##### **TNF- $\alpha$**

1. Antikörper: Maus anti-human TNF- $\alpha$  (1 mg/ml)  
 Verdünnung 1:1200 in PBS w/o Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>  
 BASF/Knoll AG, Ludwigshafen
2. Antikörper: Maus anti-human TNF- $\alpha$  (0,5 mg/ml)  
 Verdünnung: 1:1000 in Blockpuffer  
 Pharmingen, Hamburg
- Standard : rekombinantes humanes TNF- $\alpha$   
 Konzentrationsbereich 300 pg/ml bis 20 ng/ml  
 Pharmingen, Hamburg

##### **MCP-1**

1. Antikörper: Maus anti-human MCP-1 (0,5 mg/ml)  
 Verdünnung 1:500 in Beschichtungspuffer  
 Pharmingen, Hamburg
2. Antikörper: Kaninchen anti-human MCP-1 Biotin-konjugiert  
 (0,5 mg/ml)  
 Verdünnung: 1:1000 in Blockpuffer  
 Pharmingen, Hamburg
- Standard : rekombinantes humanes MCP-1  
 Konzentrationsbereich 12 pg/ml bis 12,5 ng/ml  
 IC Chemikalien, Ismaning

## **IL-1 $\beta$**

- |                |   |
|----------------|---|
| 1. Antikörper: | Maus anti-human IL-1 $\beta$ (0,5 mg/ml)<br>Verdünnung 1:1000 in Beschichtungspuffer<br>R&D, Wiesbaden    |
| 2. Antikörper: | Ziege anti-human IL-1 $\beta$ (1 mg/ml)<br>Verdünnung: 1:5000 in Blockpuffer<br>R&D, Wiesbaden            |
| 3. Antikörper: | Esel anti-Ziege IgG Peroxidasekonjugat (1 mg/ml)<br>Verdünnung: 1:5000 in Blockpuffer<br>Dianova, Hamburg |
| Standard :     | rekombinantes humanes IL-1 $\beta$<br>Konzentrationsbereich 2,4 pg/ml bis 2,5 ng/ml<br>R&D, Wiesbaden     |

### **2.3.5. Immunhistologie**

Mit Hilfe der Immunhistologie wurde untersucht, ob eine bestimmte Population der Zellen für die Expression von iNOS und somit für die Produktion von NO-Radikalen verantwortlich war. Für die intrazelluläre Anfärbung des Enzyms iNOS wurden die folgenden Methoden verwandt.

#### **2.3.5.1. Herstellung von Zytospin-Präparaten**

Diese Methode wurde gebraucht, um in vitro kultivierte und stimulierte Zellen auf einen Objektträger zu transferieren. R2 Makrophagen wurden nach der Stimulation ( $1.3 \times 10^6$  pE/cm<sup>2</sup>) wie beschrieben präpariert. Anschließend wurden sie unter Standardbedingungen zentrifugiert und in einer Konzentration von 60.000 Zellen in 100  $\mu$ l PBS + 1% FCS aufgenommen. Die Zellen wurden in einer Zytozentrifuge (Cytospin, Shandon) für 2 min bei 800 Umdrehungen auf Objektträger aufgebracht. Die Präparate wurden anschließend luftgetrocknet und bei -20° C gelagert.

### **2.3.5.2. Immunhistochemische Färbung**

Die Objektträger wurden bei 4° C aufgetaut. Die Fixierung der Zellen erfolgte in 4°C kaltem Isopropanol für 10 Minuten. Anschließend wurden die Präparate für 5 Minuten in PBS gewaschen. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurden die Präparate für 5 Minuten in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol inkubiert. Der 1. Antikörper (Kaninchen anti-Ratte iNOS (1 mg/ml); Biomol, Hamburg) wurde in einer Verdünnung von 1:300 in PBS w/o Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> + 1% BSA + 0,1% Na-Azid + 3,3 x 10<sup>-4</sup> mg Avidin für 1 h bei RT zugegeben, mit PBS abgespült und die Präparate wurden anschließend für 2 x 8 Minuten in PBS gewaschen. Die Detektion erfolgte nun mit Reagenzien des Vectastain Rabbit IgG ABC-Kits (Vector Laboratories, USA). Die Präparate wurden mit dem Ziege-anti-Kaninchen IgG in einer Verdünnung 1:400 in PBS + 5% NRS + 2x10<sup>-6</sup> Biotin für 30 Minuten inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde wiederum mit PBS abgespült und die Präparate anschließend 2 x 8 min in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden Avidin und Biotin je 1:100 verdünnt, für 30 min bei RT auf die Schnitte gegeben. Diese wurden im Anschluß mit TRIS-NaCl (10 mM TRIS, 50 mM NaCl), pH 7.6 gewaschen. Die Detektion des gebundenen Systems erfolgte mit 3'3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (0,5 mg/ml DAB in TRIS/NaCl + 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Sigma, Darmstadt). Freies DAB wurde mit Aqua destillata abgespült und die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert (Ethanol, Isopropanol, Xylol) und im Anschluß mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

### **2.42. Statistische Auswertung**

Die Prüfung auf Signifikanz erfolgte mittels T-Tests nach Student unter Zuhilfenahme des Kalkulationsprogrammes Microsoft Excel. Der Vergleich erfolgte jeweils zur unbehandelten Kontrolle. In den Abbildungen sind jeweils der Mittelwert der Proben +/- der Standardabweichung dargestellt.

In den Abbildungen sind signifikante Unterschiede mit „\*“ markiert, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit < 5 % betrug bzw. mit „\*\*\*“ bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von < 1 %.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Charakterisierung der Rattenzelllinien R2 und NR8383**

In der vorliegenden Arbeit wurde mit den Ratten-Makrophagen-Zelllinien R2 und NR8383 experimentiert. Zu Beginn der Arbeit waren diese Linien hinsichtlich der Sekretion makrophagentypischer Zytokine nur unzureichend charakterisiert. Deshalb wurde in Vorversuchen zunächst untersucht, ob mit für Makrophagen typischen Stimuli eine Induktion von Mediatoren in Zellen dieser beiden Linien erzielt werden kann. Hierzu wurden die Zellen mit LPS, IFN- $\gamma$  und der Kombination beider Substanzen stimuliert, die Kulturüberstände nach 24 Stunden abgenommen und darin die Konzentration von MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und Nitrit bestimmt.

Wichtig für die Charakterisierung der Zelllinien war, daß die verwendeten Stimuli in Bereichen eingesetzt wurden, in denen sie nicht toxisch für die Zellen waren. Als Parameter für die Bestimmung der Toxizität wurde die Freisetzung des Enzyms LDH analysiert.

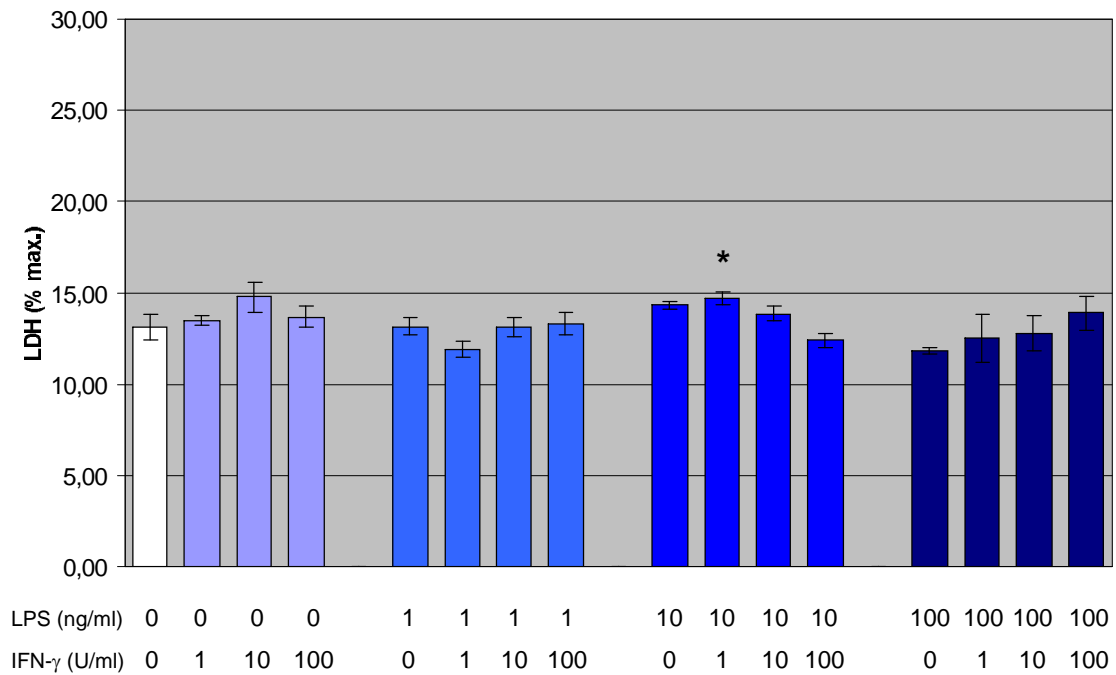
### **3.1.1. Stimulation der Alveolarmakrophagenzelllinie NR8383 mit LPS und IFN- $\gamma$**

#### **LDH Freisetzung**

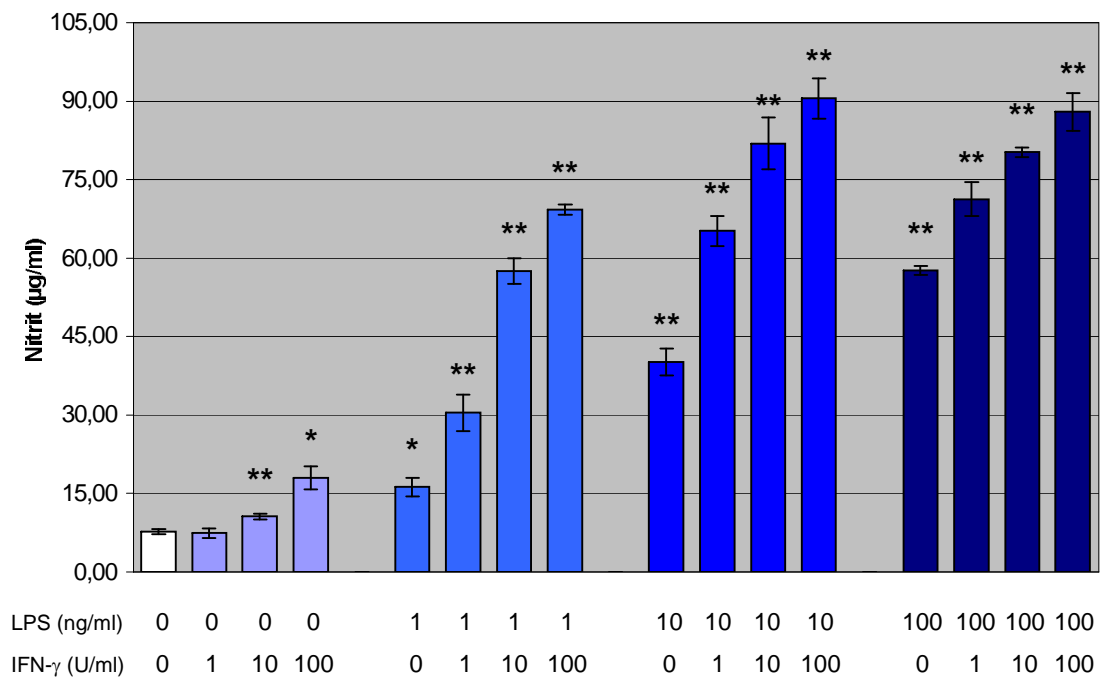
Zunächst wurde die LDH-Freisetzung der Zellen nach Stimulation mit LPS und IFN- $\gamma$  analysiert, um eine toxische Wirkung dieser Stimuli in den eingesetzten Konzentrationen auszuschließen. Die nach 24 Stunden im Kulturüberstand gemessene LDH-Konzentration wurde in Prozent vom Maximalwert (LDH<sub>100</sub>) aufgetragen. Die LDH<sub>100</sub> Konzentration wurde durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen ermittelt und repräsentiert die maximal freisetzbare Menge an LDH. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit LPS, IFN- $\gamma$  und Kostimulation mit beiden Substanzen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 dargestellt. Die Menge an gemessenem LDH lag bei allen Kulturen unabhängig vom Stimulus im Bereich des Kontrollwertes ( $13,14 \pm 0,69\%$ ). Die eingesetzten Konzentrationen der Stimuli waren also für die Zielzellen nicht toxisch.

#### **NO-Produktion**

Nach 24 Stunden Kultur wurde die Menge an produziertem Nitrit im Kulturüberstand ermittelt. Nitrit im Überstand gilt als ein Maß der NO-Produktion. Abbildung 2 stellt die Ergebnisse zusammenfassend dar. Die Zellen zeigten bereits ohne Stimulation eine Basalproduktion von  $7,70 \pm 0,49 \mu\text{g/ml}$  Nitrit. Die Freisetzung von NO konnte durch LPS dosisabhängig gesteigert werden. Die alleinige Stimulation mit IFN- $\gamma$  hatte nur einen schwachen Anstieg des Nitrits im Kulturüberstand zur Folge. Die Kombination beider Substanzen konnte am effektivsten die NO-Synthese induzieren, wobei 10 ng/ml LPS und 100 U/ml IFN- $\gamma$  die höchste Konzentration an Nitrit im Überstand induzieren ( $90,60 \pm 3,85 \mu\text{g/ml}$ ). Diese Menge ließ sich auch mit einer höheren Dosis an LPS nicht mehr steigern.



**Abbildung 1: Einfluß von LPS, IFN- $\gamma$  und deren Kombination auf die Freisetzung von LDH durch NR8383-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden.**



**Abbildung 2: Einfluß von LPS, IFN- $\gamma$  und deren Kombination auf die NO-Produktion durch NR8383-Makrophagen. Messung nach 24 h.**

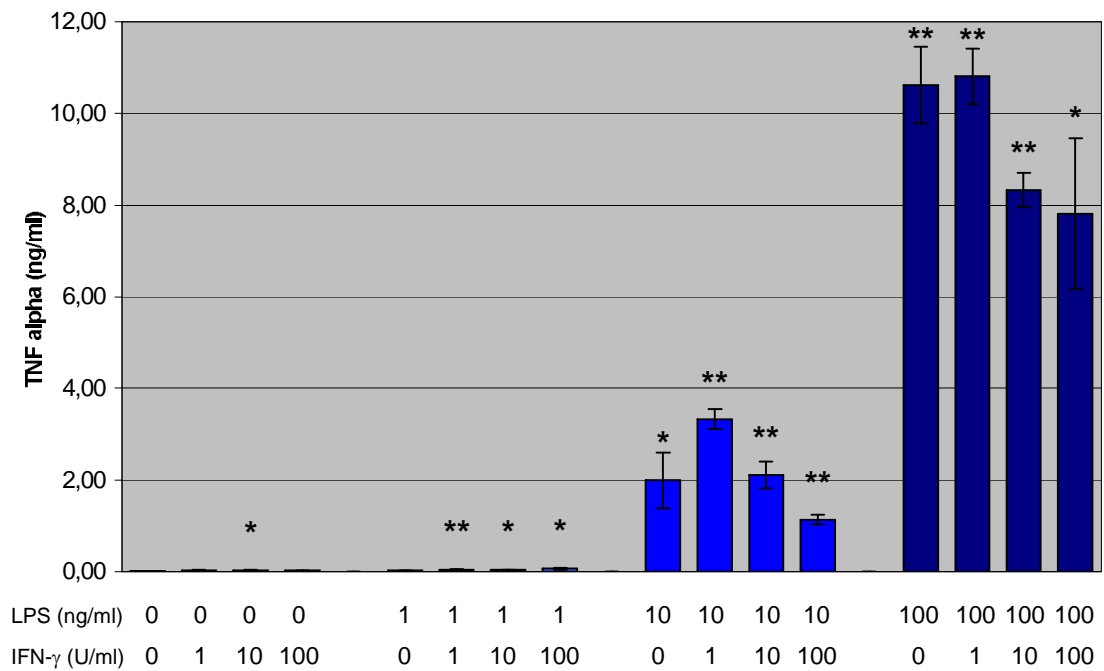


### **Freisetzung von TNF- $\alpha$**

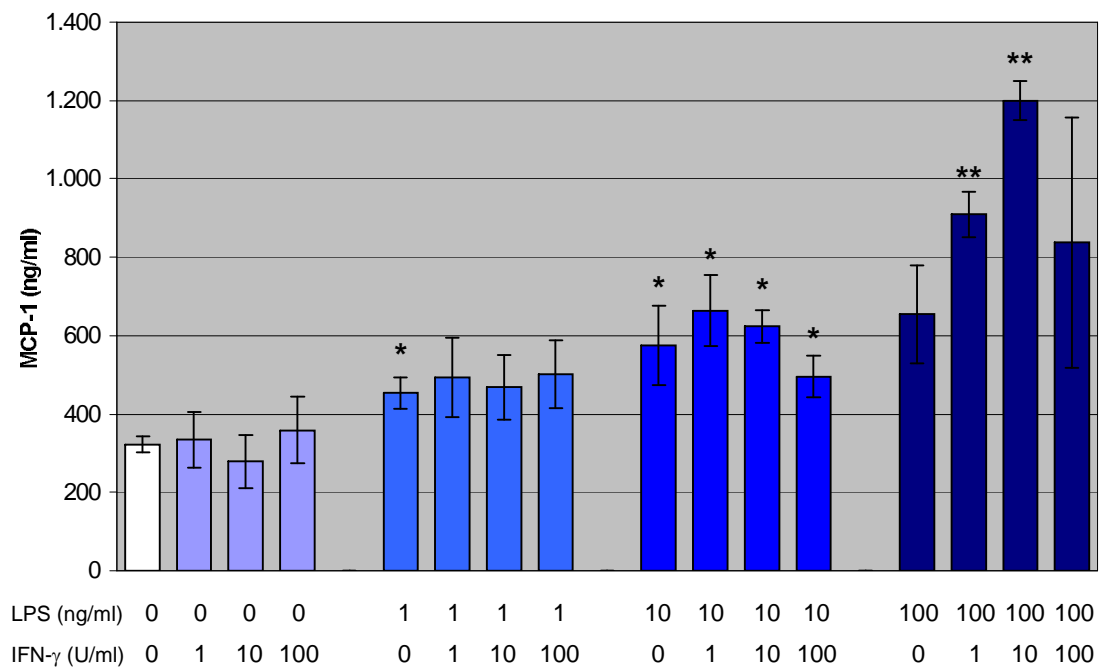
Die Synthese von TNF- $\alpha$  wird in Makrophagen durch die eingesetzten Stimuli IFN- $\gamma$  sowie LPS induziert. In NR8383-Makrophagen hatte die isolierte Gabe von IFN- $\gamma$  auf die Produktion dieses Mediators keinen Einfluß (Abbildung 3). Erst nach Kultur mit einer mittleren Dosis an LPS (10 ng/ml) war TNF- $\alpha$  im Überstand nachweisbar. Die TNF- $\alpha$ -Konzentration konnte durch IFN- $\gamma$  kaum noch gesteigert werden, bei höheren Dosen IFN- $\gamma$  zeigte sich sogar eine schwache Inhibition der LPS induzierten TNF- $\alpha$  Freisetzung. Folglich konnte die maximale Konzentration an TNF- $\alpha$  nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS und 1 U/ml IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden.

### **Freisetzung von MCP-1**

Neben TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und NO sollte auch untersucht werden, ob MCP-1 als Vertreter der Chemokine in NR8383-Zellen einer Regulation unterliegt. In Abbildung 4 sind die ermittelten MCP-1 Konzentrationen nach der Stimulation mit LPS und IFN- $\gamma$  grafisch dargestellt. Schon in den Überständen unstimulierter Zellen (Negativkontrolle) konnte eine relativ hohe Konzentration an MCP-1 ( $321,80 \pm 20,31$  ng/ml) nachgewiesen werden. Es zeigte sich, daß IFN- $\gamma$  allein keinen Effekt auf die Produktion dieses Chemokins bewirkte. Die Stimulation mit LPS führte aber zu einer dosisabhängigen Steigerung der ohnehin schon starken Produktion an MCP-1. Insbesondere bei 100 ng/ml LPS wurde deutlich, daß IFN- $\gamma$  in niedriger Konzentration (1 U/ml, 10 U/ml) die durch LPS induzierte MCP-Freisetzung noch potenzieren konnte. Ab einer Dosierung von 100 U/ml IFN- $\gamma$  wurde eine Hemmung der Produktion beobachtet, so daß bei 100 ng/ml LPS und 10 U/ml IFN- $\gamma$  der Maximalwert an meßbarem MCP-1 mit  $1,20 \mu\text{g/ml} \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$  nachgewiesen wurde.



**Abbildung 3: Einfluß von LPS, IFN- $\gamma$  und deren Kombination auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$  durch NR8383-Makrophagen. Messung nach 24 h.**

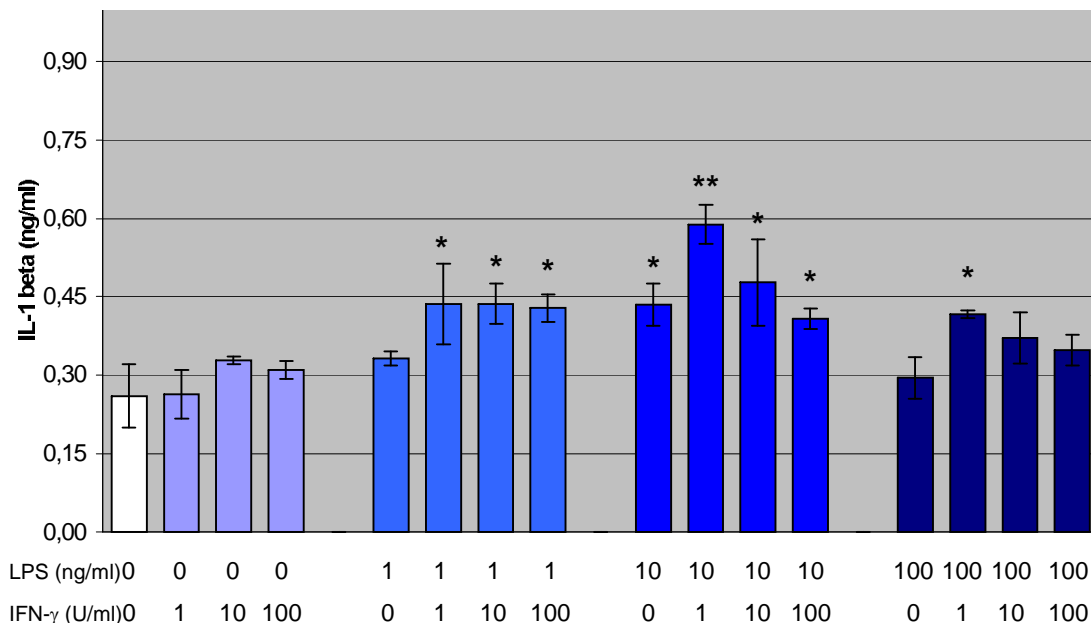


**Abbildung 4: Einfluß von LPS, IFN- $\gamma$  und deren Kombination auf die Produktion von MCP-1 durch NR8383-Makrophagen. Messung nach 24 h.**

## Freisetzung von IL-1 $\beta$

Abb. 5 zeigt die Konzentrationen an IL-1 $\beta$  in den Kulturüberständen von NR8383-Makrophagen nach Stimulation mit LPS und IFN- $\gamma$ . Die Negativkontrolle (unstimulierte Zellen) zeigte, daß diese Zellen zu einer Spontanproduktion von IL-1 $\beta$  in der Lage waren ( $260 \pm 60$  pg/ml). Durch Zugabe von LPS bis 10 ng/ml war diese Menge steigerbar, um bei 100 ng/ml LPS wieder abzunehmen. IFN- $\gamma$  hatte allein keinen Einfluß auf die Produktion dieses Zytokins. Erst die Kostimulation mit LPS und IFN- $\gamma$  zeigte einen geringfügigen Einfluß von IFN- $\gamma$  auf die Zellen.

Die Addition von 1 U/ml IFN- $\gamma$  führte zu einer Steigerung der durch LPS induzierten IL-1 $\beta$  Produktion, so daß die maximale Produktion von IL-1 $\beta$  bei 10 ng/ml LPS und 1 U/ml IFN- $\gamma$  bestimmt wurde.



**Abbildung 5: Einfluß von LPS, IFN- $\gamma$  und deren Kombination auf die Produktion von IL-1 $\beta$  von NR8383-Makrophagen. Messung nach 24 h.**

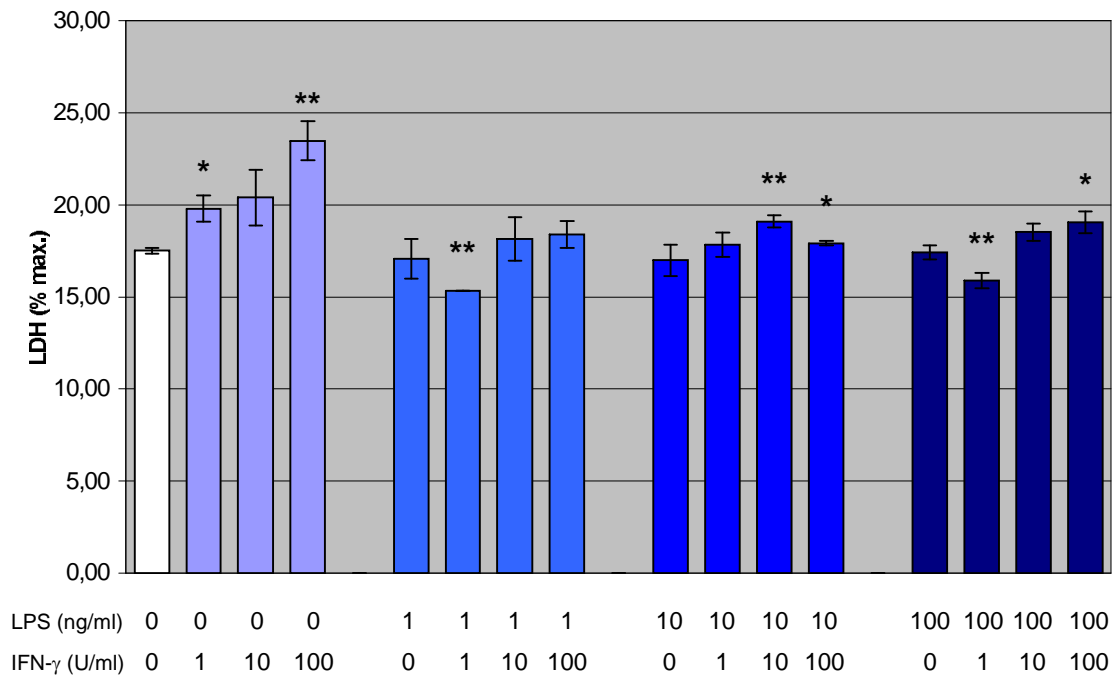
### **3.1.2. Stimulation der Pleuramakrophagenzelllinie R2 mit LPS und IFN- $\gamma$**

#### **LDH Freisetzung**

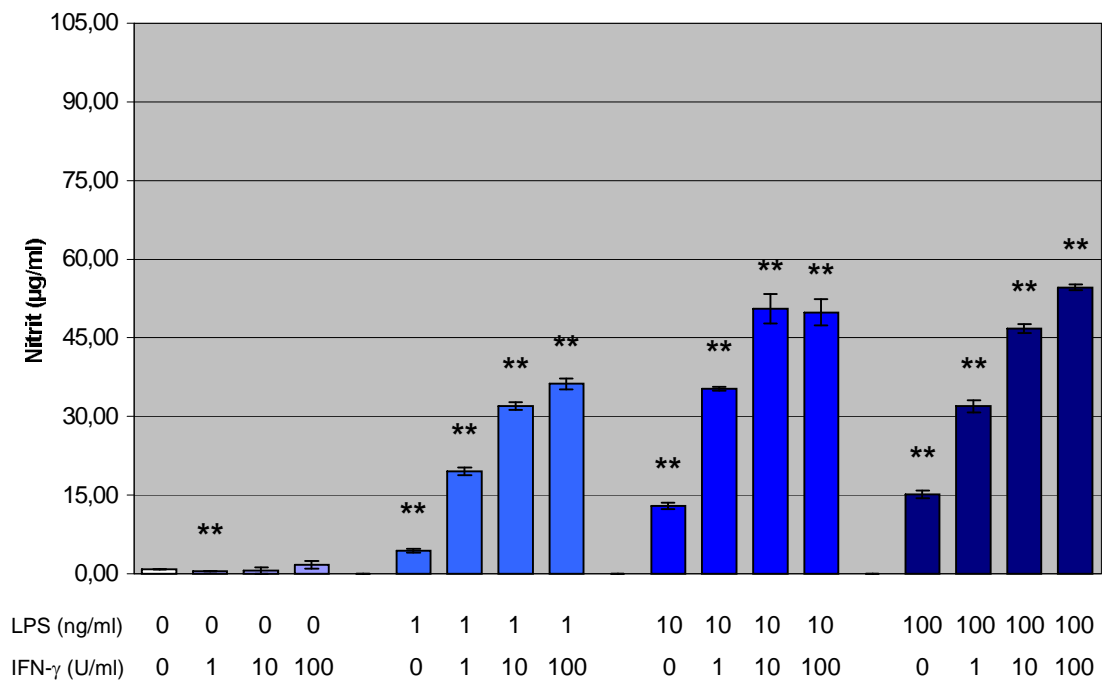
Auch für die R2-Makrophagen sollte vorab nachgewiesen werden, daß die verwandten Stimuli in physiologischen, d.h. nicht toxischen Konzentrationen eingesetzt wurden. Dazu wurden die LDH Konzentrationen der Kulturüberstände nach Stimulation der R2-Makrophagen mit LPS und IFN- $\gamma$  ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Die Negativkontrolle (unstimulierte Zellen) ergab einen Wert von  $17,50 \pm 0,16\%$  der LDH<sub>100</sub>. Es zeigte sich, daß nach der Gabe von IFN- $\gamma$ , ein leichter Anstieg der LDH in den Kulturüberständen zu verzeichnen war. Dieser Effekt war dosisabhängig. LPS dagegen hatte keinen Einfluß auf die Freisetzung dieses Enzyms.

#### **NO-Produktion**

In Abbildung 7 ist die nach 24 h gemessene Konzentration an produziertem Nitrit nach Stimulation der Zellen mit LPS und IFN- $\gamma$  dargestellt. Die R2-Makrophagen zeigten in der Negativkontrolle (unstimulierte Zellen), daß sie spontan nur Spuren an NO produzieren ( $0,80 \pm 0,53 \mu\text{g/ml}$ ). LPS war in der Lage die Produktion von NO zu induzieren, folglich kam es dosisabhängig zu einem Anstieg an Nitrit im Kulturüberstand. IFN- $\gamma$  hatte alleine keinen Effekt. Erst die Kombination aus beiden Stimuli zeigte einen potenzierenden Effekt von IFN- $\gamma$  auf die NO-Produktion, so daß nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS und 100 U/ml IFN- $\gamma$  der Maximalwert ( $54,60 \pm 0,50 \mu\text{g/ml}$ ) der NO-Freisetzung gemessen wurde.



**Abbildung 6: Einfluß von LPS, IFN- $\gamma$  und deren Kombination auf die Freisetzung von LDH durch R2-Makrophagen. Messung nach 24 h.**



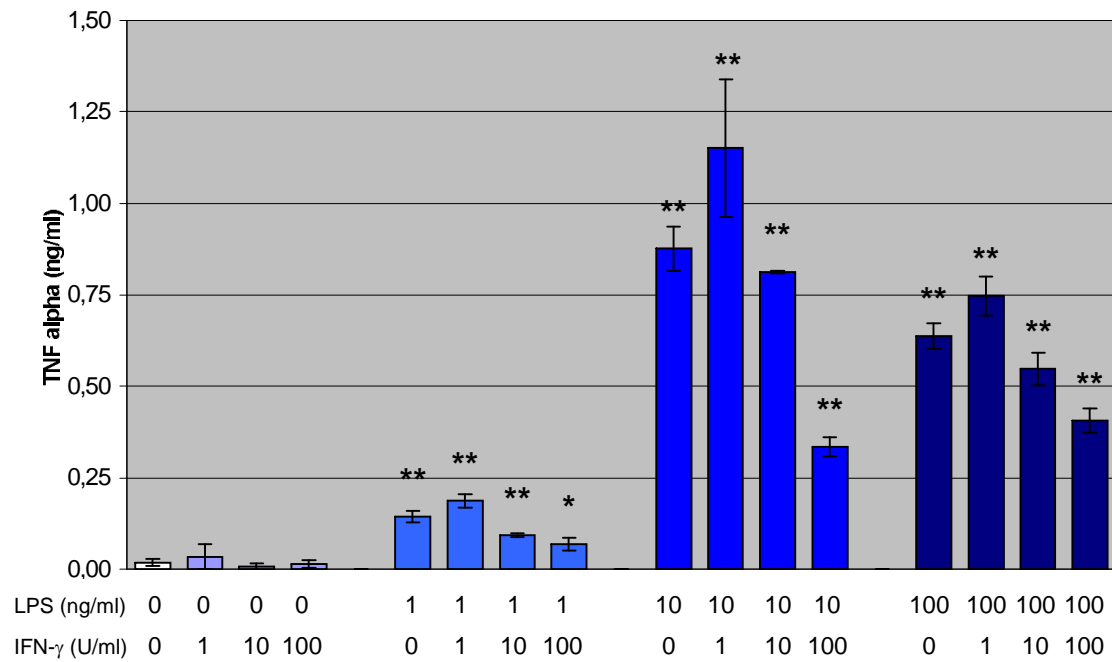
**Abbildung 7: Einfluß von LPS, IFN- $\gamma$  und deren Kombination auf die Freisetzung von NO durch R2-Makrophagen. Messung nach 24 h.**

## **Freisetzung von TNF- $\alpha$**

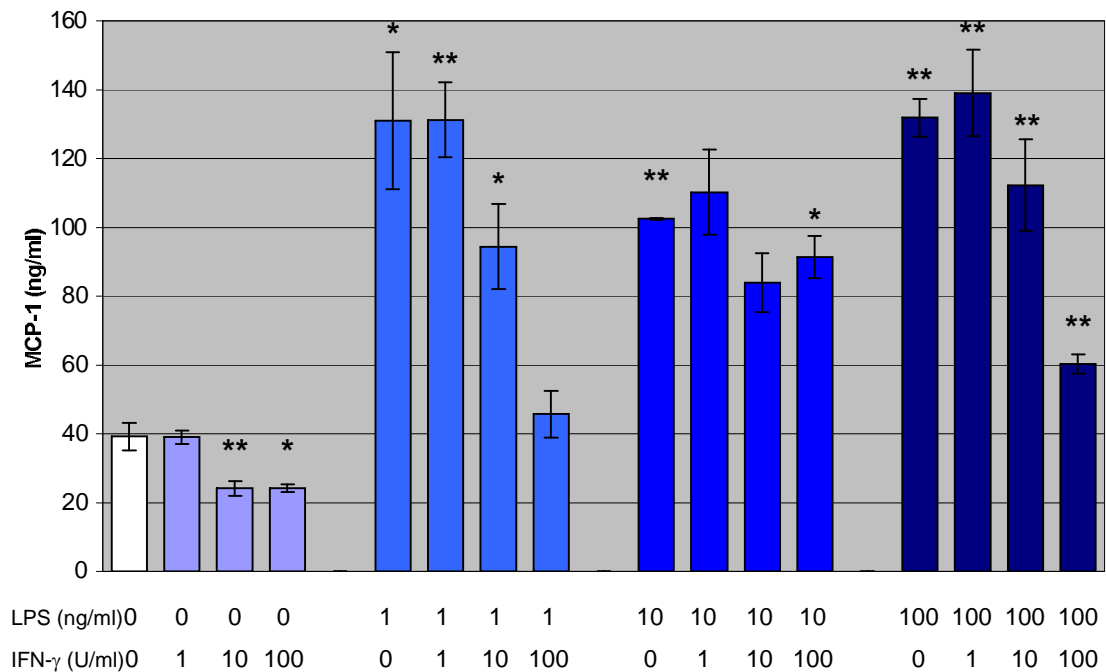
In diesem Versuch wurde der Einfluß von LPS und IFN- $\gamma$  auf die TNF- $\alpha$ -Produktion von R2-Makrophagen untersucht. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse dient Abbildung 8. Weder in der Negativkontrolle noch in den Proben nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  konnte TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden. Die Stimulation mit LPS führte zu einer Induktion der TNF- $\alpha$ -Freisetzung bei LPS-Konzentrationen bis zu 10 ng/ml. Bei 100 ng/ml LPS wurden geringere TNF- $\alpha$ -Mengen freigesetzt. IFN- $\gamma$  war bei Kostimulation in der Lage, einen geringfügig potenzierenden Effekt auf die TNF- $\alpha$ -Produktion auszuüben. Allerdings galt dies nur für die niedrigste eingesetzte Konzentration von IFN- $\gamma$ . Höhere Dosierungen (10 und 100 U/ml) führten zu einer Hemmung der durch Endotoxin hervorgerufenen TNF- $\alpha$ -Produktion. Die optimale Stimulation erfolgte mit 10 ng/ml LPS und 1 U/ml IFN- $\gamma$ , hier ergab sich der Maximalwert an TNF- $\alpha$  von  $1,15 \pm 0,18$  ng/ml.

## **Freisetzung von MCP-1**

Die durch die R2-Makrophagen nach Stimulation mit LPS und IFN- $\gamma$  freigesetzten Mengen an MCP-1 sind in Abbildung 9 dargestellt. Es zeigte sich, wie bereits auch bei NR8383-Makrophagen beobachtet, daß in der Negativkontrolle (unstimulierte Zellen) deutliche Mengen an MCP-1 zu finden waren ( $39,20 \pm 3,56$  ng/ml). LPS führte in allen Dosierungen zu einem deutlichen Anstieg dieses Chemokins im Kulturüberstand. Bereits bei 1 ng/ml LPS wurde eine MCP-1-Freisetzung gemessen, die auch durch höhere LPS-Dosen nicht mehr gesteigert werden konnte. Die Stimulation mit IFN- $\gamma$  zeigte einheitlich eine Inhibition der MCP-1-Freisetzung, dieser Effekt trat vor allem bei höheren Dosierungen auf.



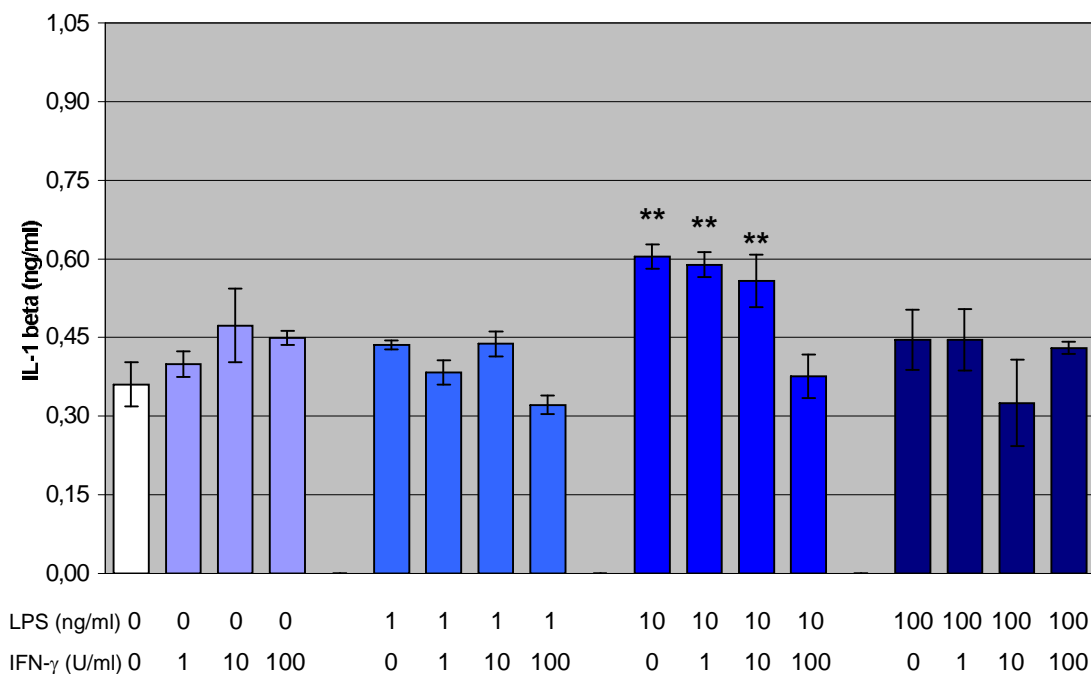
**Abbildung 8: Einfluß von LPS, IFN- $\gamma$  und deren Kombination auf die Produktion von TNF- $\alpha$  durch R2-Makrophagen. Messung nach 24 h.**



**Abbildung 9: Einfluß von LPS, IFN- $\gamma$  und deren Kombination auf die Produktion von MCP-1 durch R2-Makrophagen. Messung nach 24 h.**

## Freisetzung von IL-1 $\beta$

In diesem Versuch wurde der Einfluß von LPS und IFN- $\gamma$  auf die IL-1 $\beta$ -Freisetzung ermittelt. Es zeigte sich (Abbildung 10), daß die Zellen bereits ohne Stimulation IL-1 $\beta$  produzierten ( $0,36 \pm 0,04$  ng/ml). Diese Menge konnte nur mit einer mittleren Dosis an LPS (10 ng/ml) geringfügig gesteigert werden. Niedrige (1 ng/ml) und auch hohe (100 ng/ml) Konzentrationen des Endotoxins zeigten keine Wirkung. Die Kostimulation der Zellen mit 10 ng/ml LPS und verschiedenen Dosen IFN- $\gamma$  zeigte einen hemmenden Einfluß von IFN- $\gamma$  auf die IL-1 $\beta$  Freisetzung.



**Abbildung 10: Einfluß von LPS, IFN- $\gamma$  und deren Kombination auf die Freisetzung von MCP-1 durch R2-Makrophagen. Messung nach 24 h.**

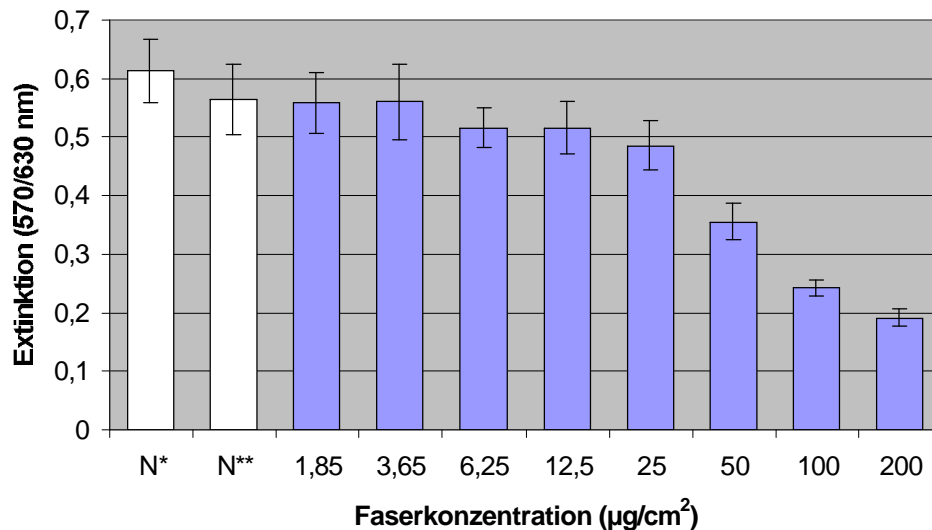


### **3.2. Ermittlung der toxischen Schwellendosis der verschiedenen Faser- und Partikelpräparationen**

Um modulierende Effekte der verschiedenen Faser- und Partikelpräparationen auf Makrophagenfunktionen zu untersuchen, mußten diese in für die Zellen nicht toxischen Dosen eingesetzt werden. Deshalb wurde zu Beginn der Versuche für jede Faserpräparation mittels MTT-Tests die Dosis ermittelt, ab welcher es zu toxischen Wirkungen auf die Zellen kommt. Exemplarisch wurden diese Untersuchungen mit Zellen der Makrophagenlinie R2-durchgeführt. Die Zellen wurden für 24 h mit allen Faser- und Partikelpräparationen im Konzentrationsbereich von  $1,85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  bis  $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  inkubiert. Als Negativkontrolle wurde zum einen PBS w  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  als auch der letzte Waschüberstand der Faserpräparationen eingesetzt. Im Anschluß daran wurde der MTT-Test durchgeführt.

#### **3.2.1. Einfluß von Titandioxid auf die Vitalität von R2-Makrophagen**

Die Wirkung von Titandioxid auf die Vitalität von R2-Makrophagen ist in Abb. 11 grafisch dargestellt. Konzentrationen bis zu  $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  haben nur einen geringen Effekt auf die Stoffwechselaktivität der Zellen zur Folge. Höhere Dosierungen lassen eine signifikante Abnahme des MTT-Umsatzes erkennen, so daß ab  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  von einer toxischen Wirkung von Titandioxid auf die Makrophagen auszugehen ist.

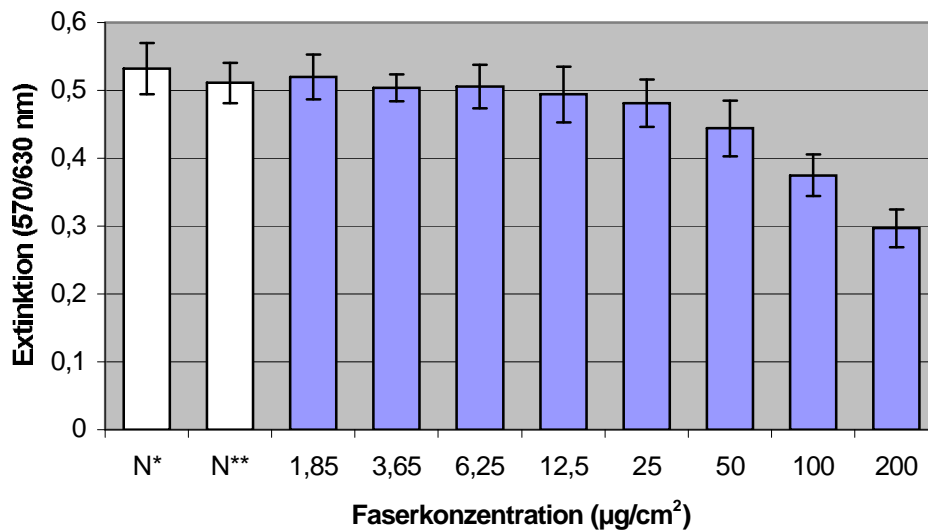


**Abbildung 11: Einfluß von Titandioxid auf die Vitalität von R2-Makrophagen.** N\*=Faserüberstand N\*\*=PBS w  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ . Die Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an Titandioxid inkubiert und anschließend mittels MTT-Test analysiert.

### 3.2.2. Einfluß von $\alpha$ -Christobalit auf die Vitalität von R2-Makrophagen

Von  $\alpha$ -Christobalit weiß man, daß es auf Makrophagen eine toxische Wirkung ausübt. Abbildung 12 stellt die Dosis-Wirkungs-Beziehung von diesen Partikeln auf die Vitalität von R2-Makrophagen nach 24-stündiger Inkubation dar.

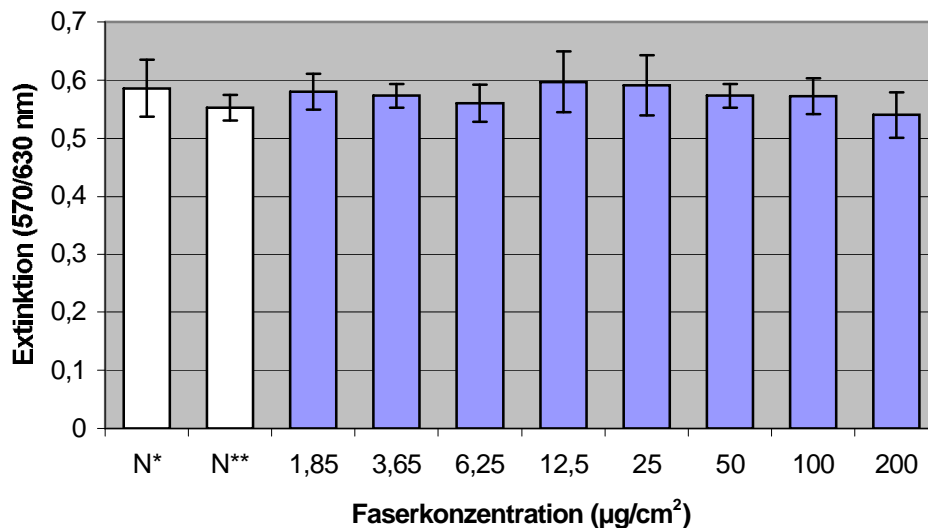
Es zeigte sich, daß die Zellen ab einer Konzentration von 100 µg/cm² weniger MTT-Farbstoff umsetzten, folglich  $\alpha$ -Christobalit ab dieser Konzentration toxisch für R2-Zellen ist.



**Abbildung 12:** Einfluß von  $\alpha$ -Christobalit auf die Vitalität von R2-Makrophagen. N\*=Faserüberstand N\*\*=PBS w  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ . Die Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von  $\alpha$ -Christobalit inkubiert und anschließend mittels MTT-Test analysiert.

### 3.2.3. Einfluß von Keramikfasern auf die Vitalität von R2-Makrophagen

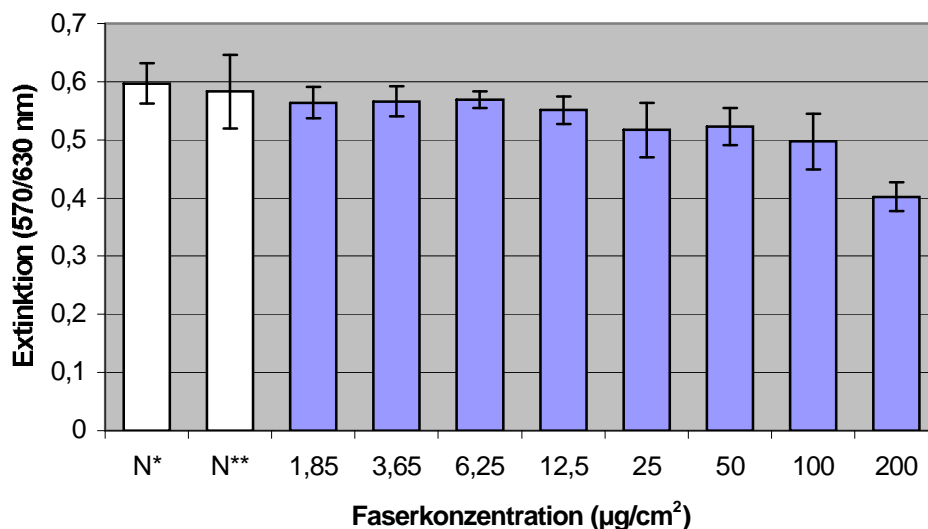
Mit diesem Versuch sollte der toxische Schwellenwert von Keramikfasern auf R2-Makrophagen ermittelt werden. Die Stoffwechselaktivität der R2-Makrophagen wurde mittels MTT-Test nach Inkubation mit Keramikfasern in verschiedenen Konzentrationen gemessen. Es konnte gezeigt werden (Abbildung 13), daß in den eingesetzten Konzentrationen keine Effekte auf die Vitalität der Zellen nachweisbar waren. Die Werte für die Extinktion lagen für alle Konzentrationen im Bereich der beiden Kontrollen. Keramikfasern sind somit für die Makrophagen in Konzentrationen  $\leq 200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  nicht toxisch.



**Abbildung 13:** Einfluß von Keramikfasern auf die Vitalität von R2-Makrophagen. N\*=Faserüberstand N\*\*=PBS w  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ . Die Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von Keramikfasern inkubiert und anschließend mittels MTT-Test analysiert.

#### 3.2.4. Einfluß von Glaswolle auf die Vitalität von Makrophagen

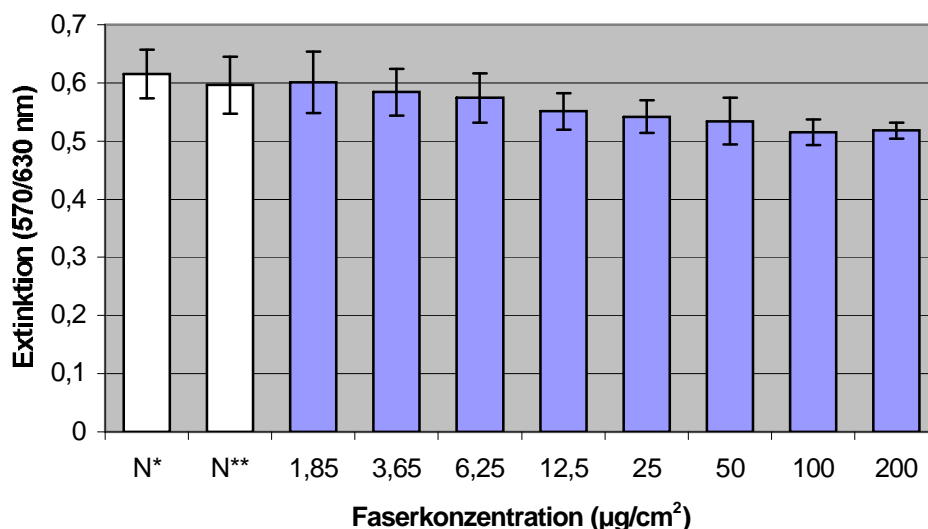
In diesem Versuchsansatz wurde die Stoffwechselaktivität der R2-Makrophagen nach 24 stündiger Exposition mit verschiedenen Faserkonzentrationen von Glaswolle bestimmt. Erst bei einer Konzentration von 200 µg/cm² kam es zu einer nachweisbaren Einschränkung der Vitalität der Zellen (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Einfluß von Glaswolle auf die Vitalität von R2-Makrophagen. N\*=Faserüberstand N\*\*=PBS w  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ . Die Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von Glaswolle inkubiert und anschließend mittels MTT-Test analysiert.

### 3.2.5. Einfluß von Steinwolle auf die Vitalität von R2-Makrophagen

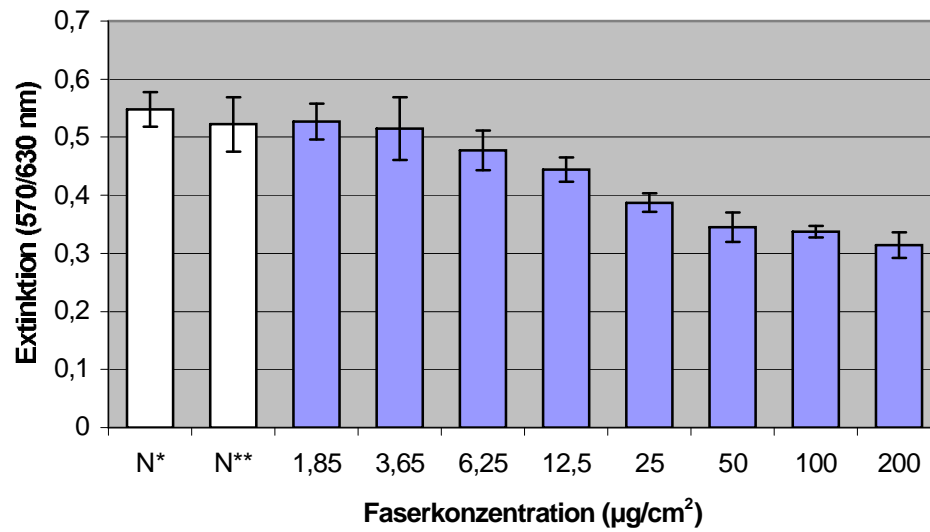
Der Einfluß von Steinwolle auf die Vitalität der Zellen wurde in diesem Versuch ermittelt. In der Abbildung 15 ist die Vitalität von R2-Makrophagen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration Steinwolle nach 24 h Inkubation dargestellt. Es zeigte sich, daß keine der eingesetzten Konzentrationen einen toxischen Einfluß auf die Zellen hatte.



**Abbildung 15:** Einfluß von Steinwolle auf die Vitalität von R2-Makrophagen. N\*=Faserüberstand N\*\*=PBS w  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ . Die Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von Steinwolle inkubiert und anschließend mittels MTT-Test analysiert.

### 3.2.6. Einfluß von Asbest auf die Vitalität von R2-Makrophagen

Von Asbest sind zytotoxische Effekte auf Zellen prinzipiell bekannt. Dieser Versuch sollte dessen Wirkung auf R2-Makrophagen mit Hilfe einer Asbest-Verdünnungsreihe ermitteln. R2-Makrophagen reagierten schon ab einer Konzentration von  $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  mit einer eingeschränkten Stoffwechselleistung. Höhere Asbest-Konzentrationen führten zu einer weiteren Inhibition des MTT-Umsatzes (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Einfluß von Asbest auf die Vitalität von R2-Makrophagen. N\*=Faserüberstand N\*\*=PBS w  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ . Die Zellen wurden für 24h mit verschiedenen Konzentrationen von Asbest inkubiert und anschließend mittels MTT-Test analysiert.

### **3.3      Einfluß von Fasern und Partikeln auf die Produktion von Mediatoren durch Makrophagen**

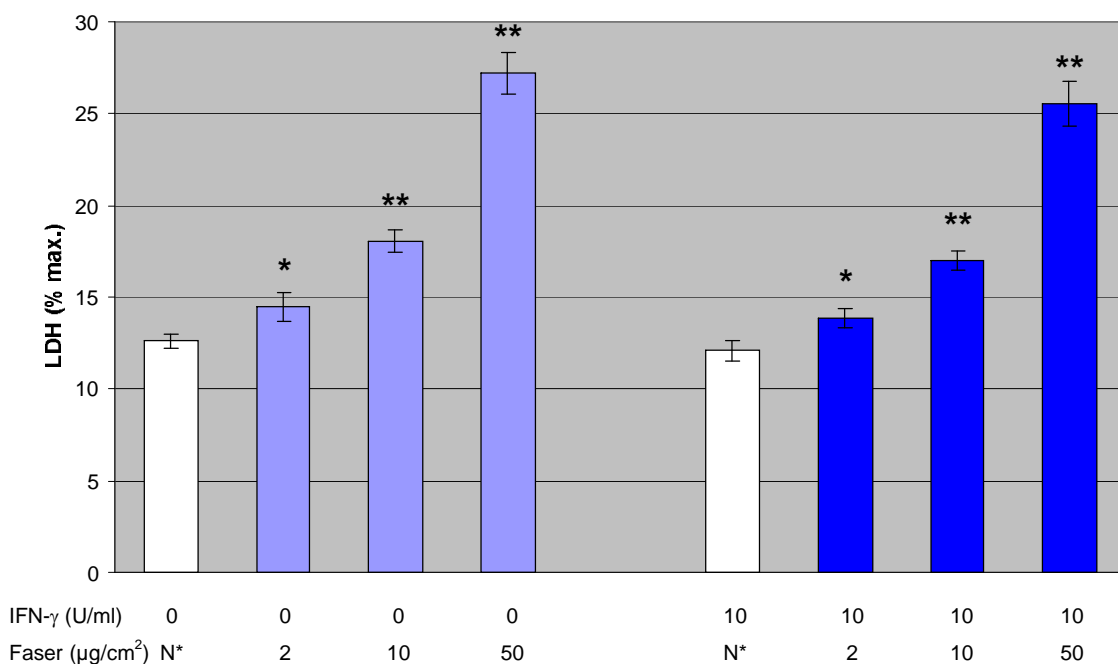
Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, ein Testsystem zu entwickeln, mit dem eine krankheitsverursachende Potenz von mineralischen Fasern einfach, kostengünstig und sicher vorhersagbar werden könnte. Dafür war es zunächst notwendig, die Wirkungen bereits als pathogen bekannter Fasern auf Makrophagen zu untersuchen, um herauszufinden, ob bestimmte Marker exprimiert werden, die mit der Pathogenität korrelieren. Diese Wirkungen sollten dann mit denen von Fasern verglichen werden, über deren Toxizität zur Zeit noch Unklarheit besteht.

Von Siliziumdioxid und Asbest ist die Pathogenität bereits bekannt, diese Materialien wurden daher als Positivkontrolle eingesetzt. Die zu prüfenden Substanzen waren Titandioxid, Keramik, Glaswolle und Steinwolle. Der Einfluß auf Makrophagenfunktionen wurde anhand der Freisetzung von LDH, NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und MCP-1 nach 24 h Inkubation mit und ohne zusätzlicher Stimulation durch IFN- $\gamma$  bestimmt. Als Negativkontrolle wurde der Faserüberstand eingesetzt (siehe 2.2.2.1.).

### 3.3.1. Stimulation der Makrophagenzelllinie NR8383 mit den Faser-/Partikel Präparationen

#### 3.3.1.1. Einfluß der Fasern und Partikel auf die Vitalität der NR8383-Makrophagen

Unsere Untersuchungen zeigten, daß in den eingesetzten Konzentrationen insbesondere Asbest eine dosisabhängige Zytotoxizität aufwies (Abbildung 17). Einen geringen Anstieg der LDH-Freisetzung verursachten Titandioxid, Keramik und Steinwolle. Dieser Anstieg war dosisunabhängig. Nach Behandlung der Makrophagen mit  $\alpha$ -Christobalit bzw. Steinwolle konnte im gesamten Konzentrationsbereich kein Einfluß auf die LDH-Freisetzung festgestellt werden.

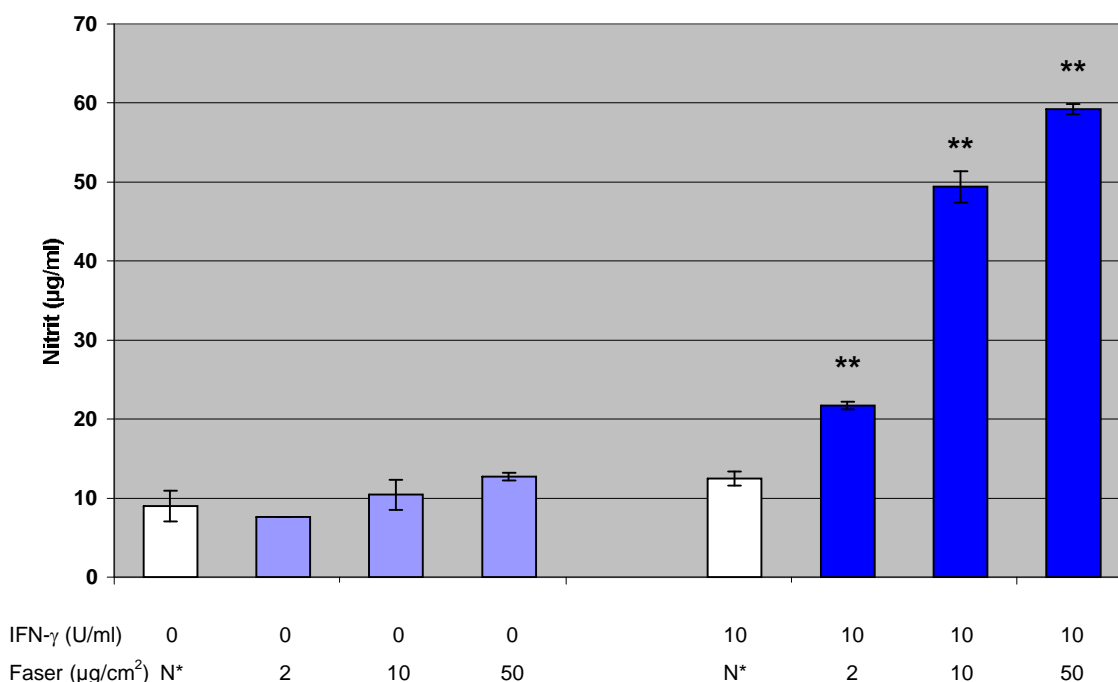


**Abbildung 17: Einfluß von Asbestfasern mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von LDH nach Stimulation von NR8383-Makrophagen für 24 h. N\* = Faserüberstand**

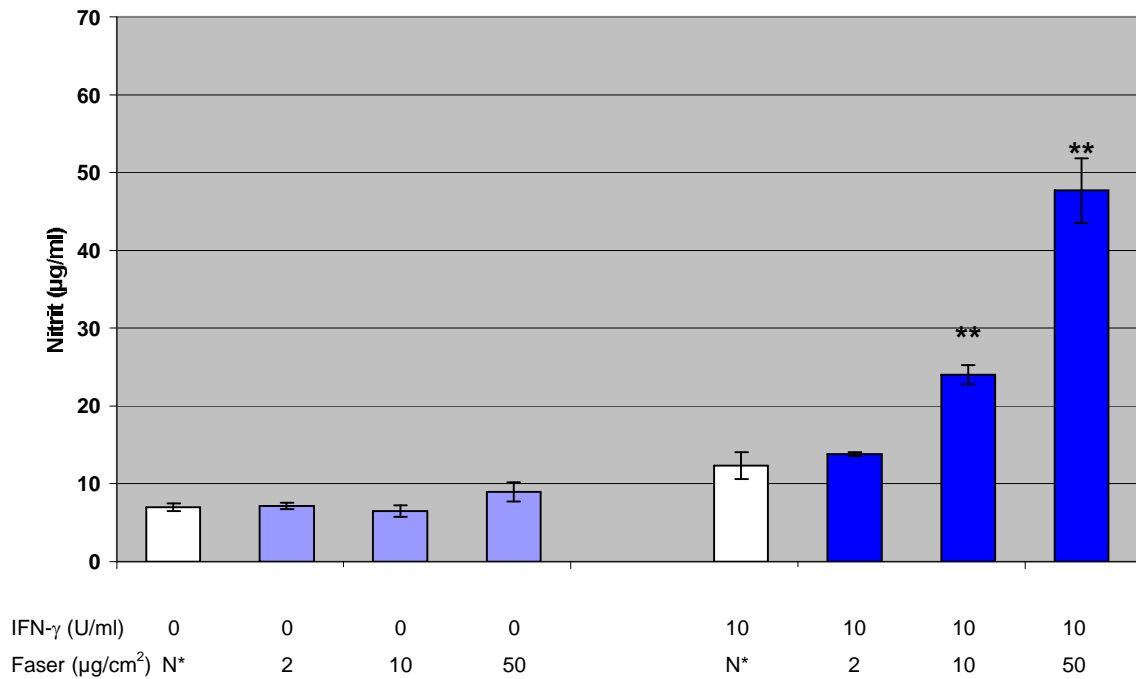


### 3.3.1.2. Einfluß der Fasern und Partikel auf die Produktion von NO-Radikalen durch NR8383-Makrophagen

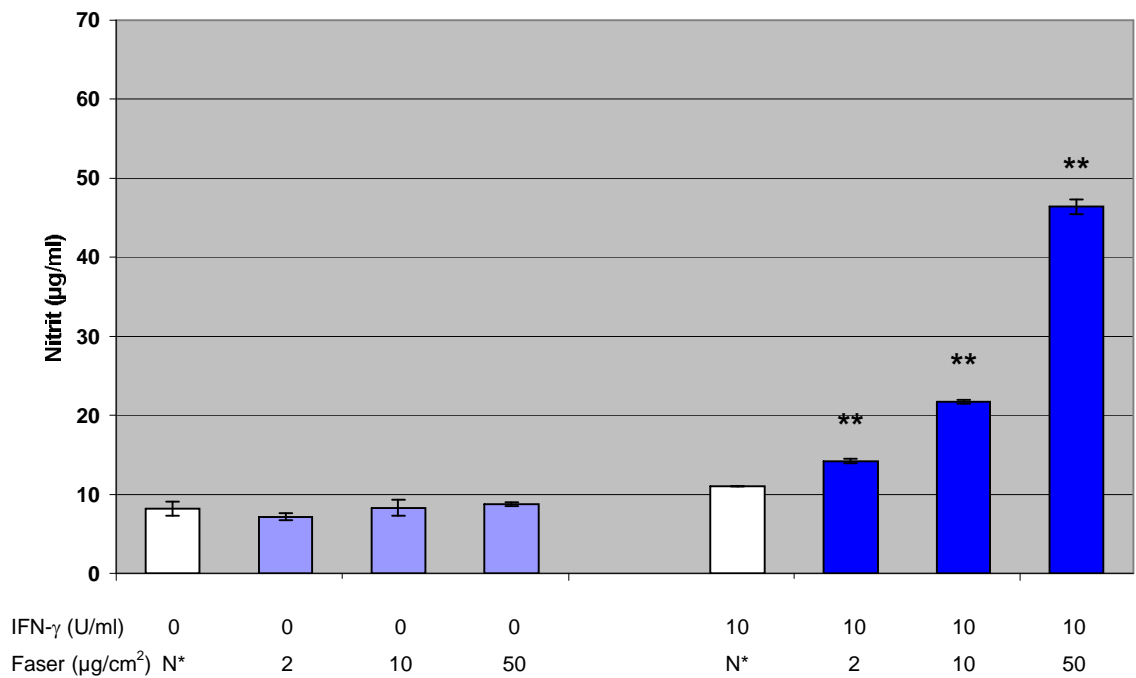
Für keine der eingesetzten Fasern/Partikel konnte eine Induktion der Freisetzung von NO nachgewiesen werden. Es konnte aber gezeigt werden, daß alle Präparationen in der Kombination mit IFN- $\gamma$  eine dosisabhängige Stimulation der Produktion von zytotoxischen NO-Radikalen verursachten. Am stärksten war dieser Effekt bei den Asbestfasern ausgeprägt (Abbildung 23). Hier wurde allerdings bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  wieder ein Rückgang der NO-Produktion beobachtet, der aber aufgrund der Ergebnisse der LDH-Messung als ein zytotoxisch bedingter Effekt eingestuft werden kann. In den Abbildungen 18 bis 23 werden die Konzentrationen an Nitrit im Überstand der mit unterschiedlichen Fasern und Partikeln stimulierten Zellen dargestellt. Während Steinwolle und Glaswolle nur einen marginalen Anstieg der NO-Freisetzung nach Stimulation mit 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  verursachten, zeigten Titandioxid, Christobalit und Keramik ab 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  und Asbest sogar ab 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  bereits deutlich stimulierende Effekte.



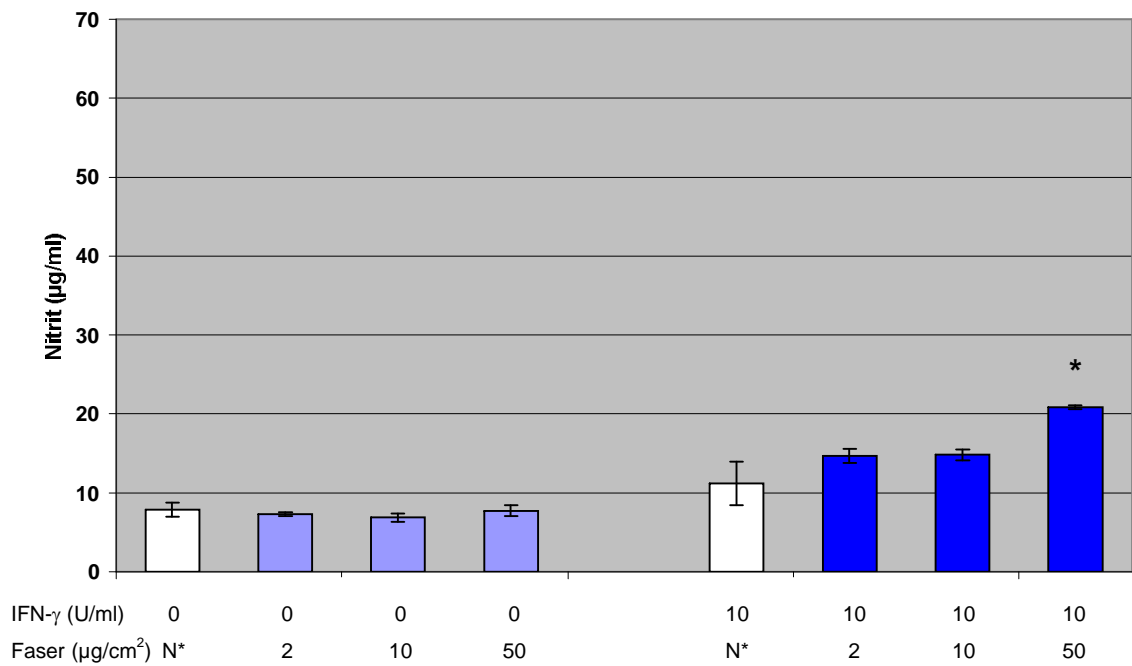
**Abbildung 18: Einfluß von Titandioxid mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von Nitrit nach Stimulation von NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



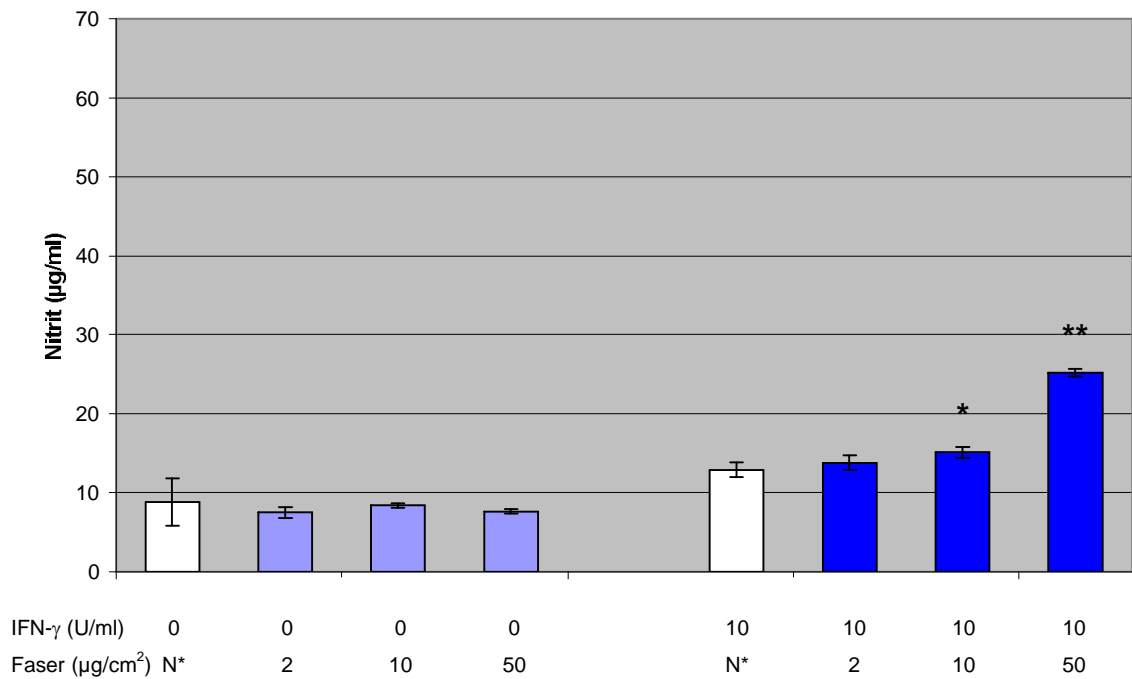
**Abbildung 19: Einfluß von  $\alpha$ -Christobalit mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von Nitrit nach Stimulation von NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



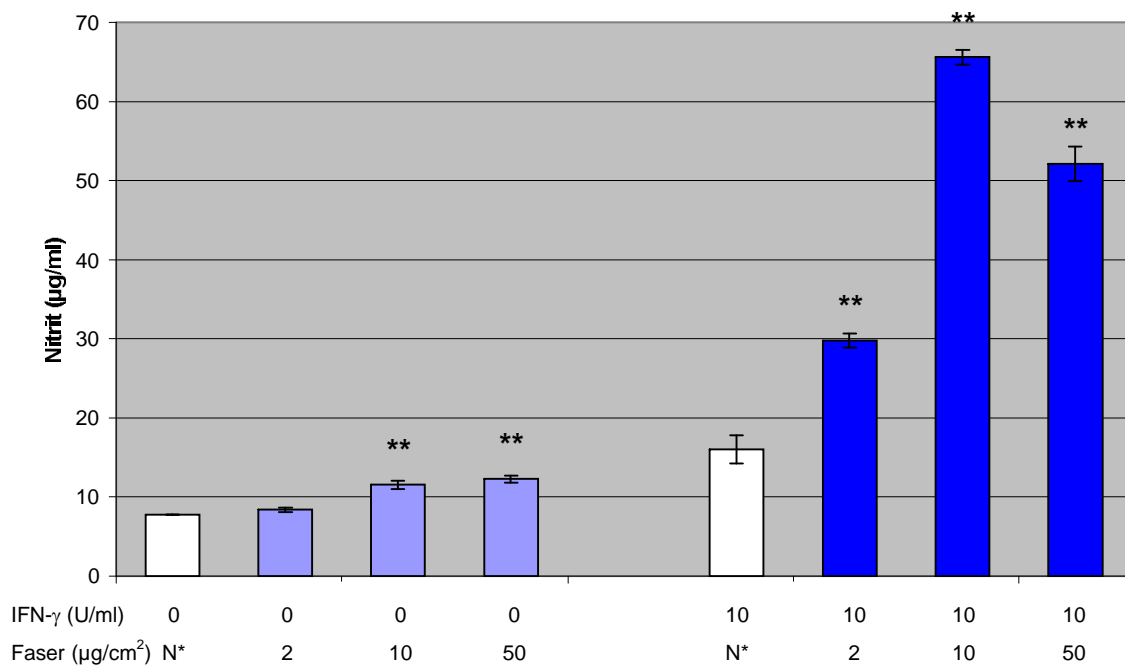
**Abbildung 20: Einfluß von Keramikfasern mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von Nitrit nach Stimulation von NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



**Abbildung 21:** Einfluß von Glaswolle mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von Nitrit nach Stimulation von NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.



**Abbildung 22:** Einfluß von Steinwolle mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von Nitrit nach Stimulation von NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.

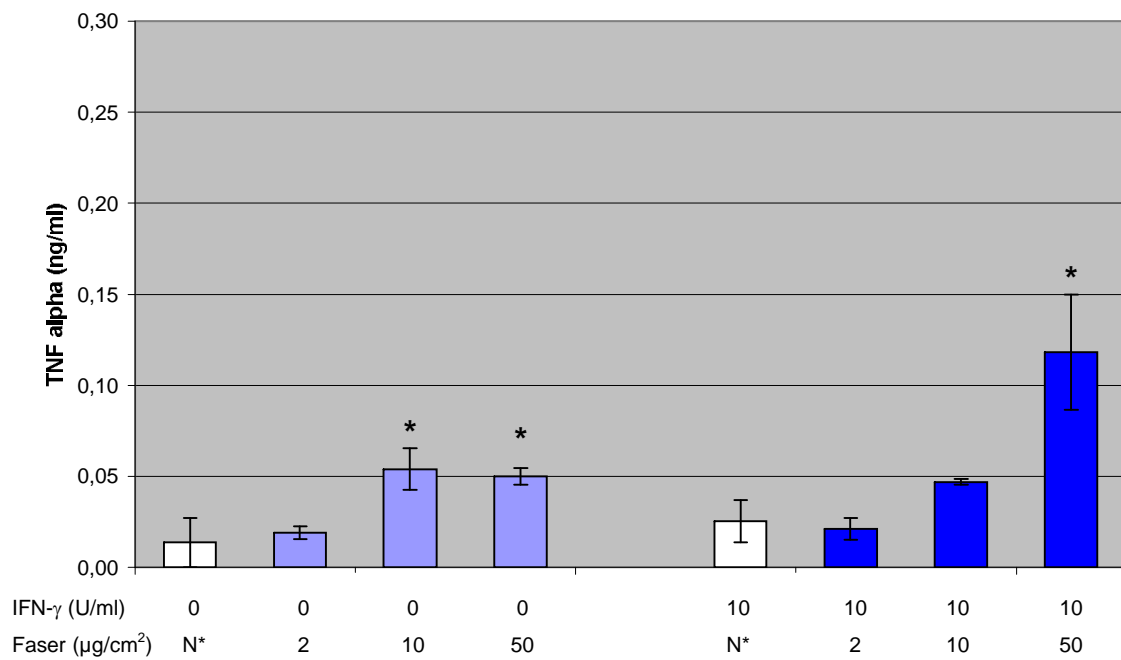


**Abbildung 23: Einfluß von Asbestfasern mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von Nitrit nach Stimulation von NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**

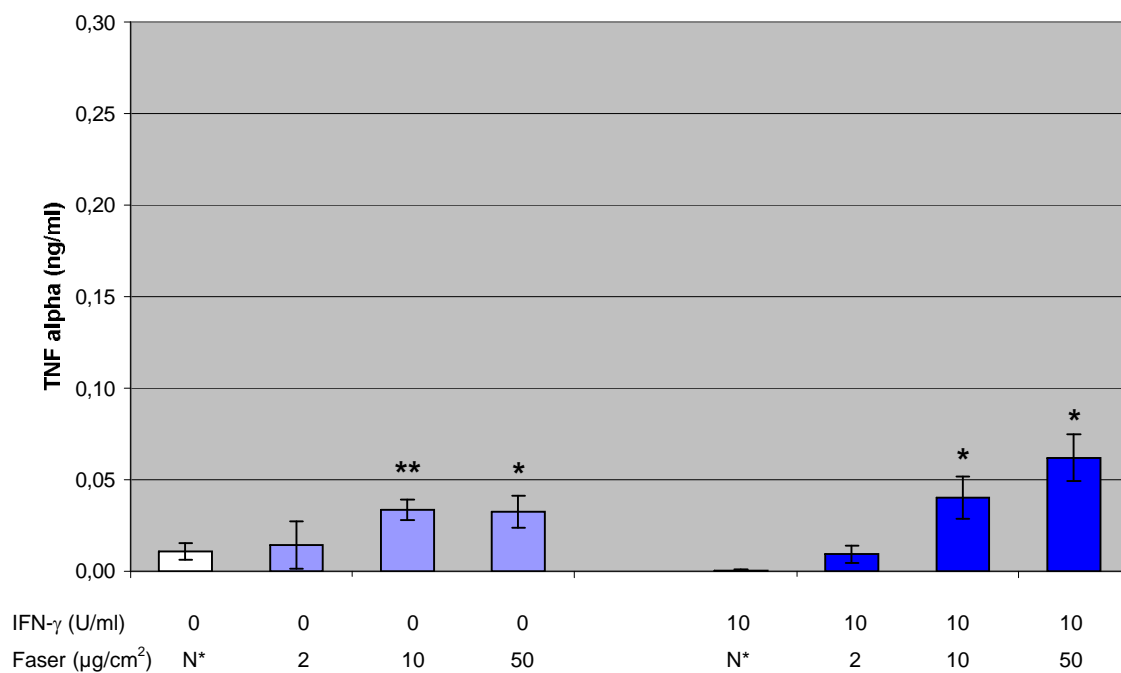
### **3.3.1.3. Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$ durch NR8383-Makrophagen**

Auf eine 24-stündige Stimulation mit Partikeln und Fasern reagierten NR8383-Makrophagen in einigen Fällen mit der Produktion von TNF- $\alpha$ . Titandioxid induzierte diese Produktion schon bei der Inkubation ohne IFN- $\gamma$  in Konzentrationen von 10 und 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , allerdings wurde dieser Effekt durch IFN- $\gamma$  bei 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Titandioxid noch verstärkt (Abbildung 24). Christobalit zeigte in diesem Experiment analoge Effekte zu Titandioxid. Die Produktion von TNF- $\alpha$  wurde bei gleichen Dosen ebenfalls induziert, und die Kostimulation mit IFN- $\gamma$  führte zu einem weiteren Anstieg (Abbildung 25). Am deutlichsten waren die Effekte allerdings bei Asbest. Auch hier war bei der alleinigen Inkubation mit der Faser ein Anstieg des TNF- $\alpha$  im Kulturüberstand zu verzeichnen. Es zeigte sich, daß in der Kostimulation mit IFN- $\gamma$  diese Produktion noch wesentlich gesteigert wurde (Abbildung 26).

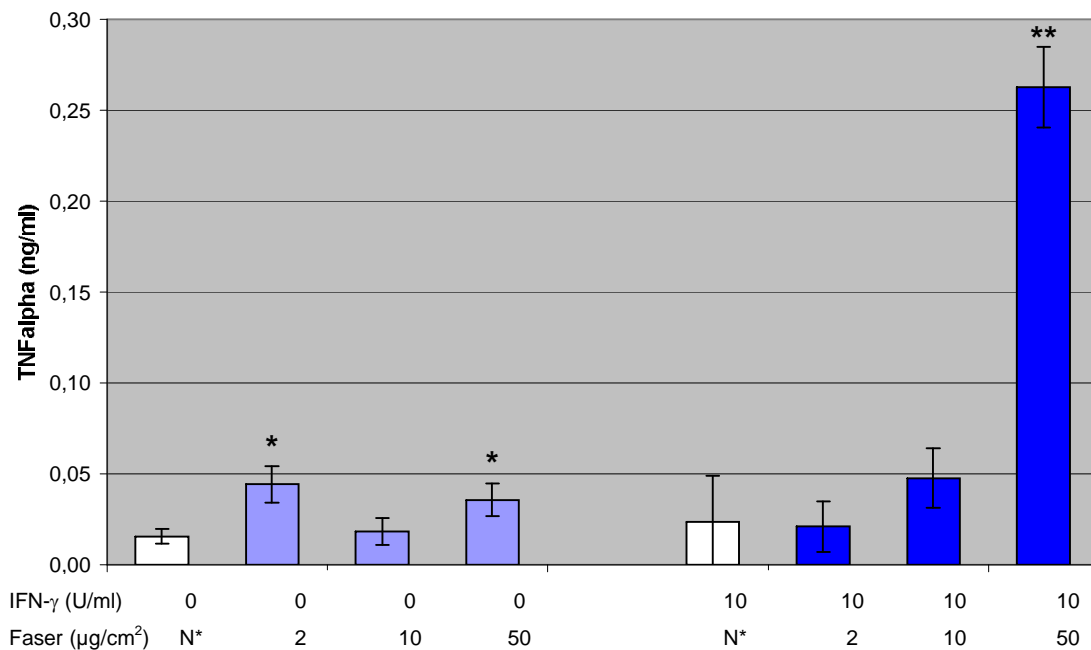
Bei Inkubation der Zellen mit Keramik, Steinwolle bzw. Glaswolle konnte nach 24 Stunden Stimulation kein TNF- $\alpha$  im Überstand nachgewiesen werden. Das galt auch für die Kostimulation mit IFN- $\gamma$ .



**Abbildung 24: Einfluß von Titandioxid mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$  nach Stimulation von NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



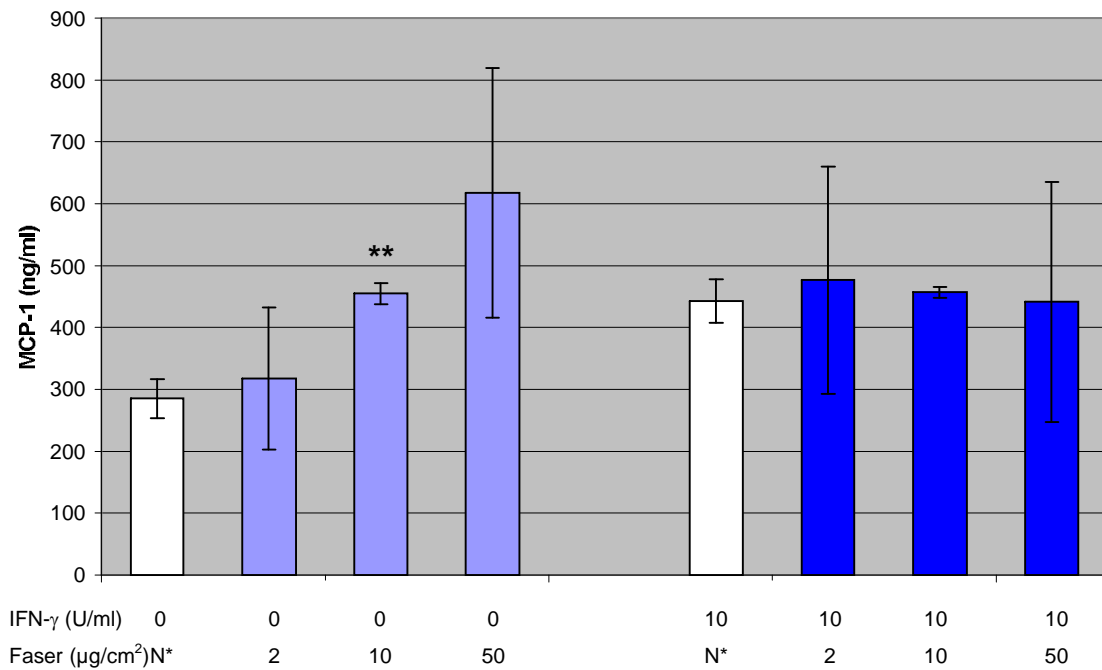
**Abbildung 25: Einfluß von  $\alpha$ -Christobalit mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$  nach Stimulation von NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



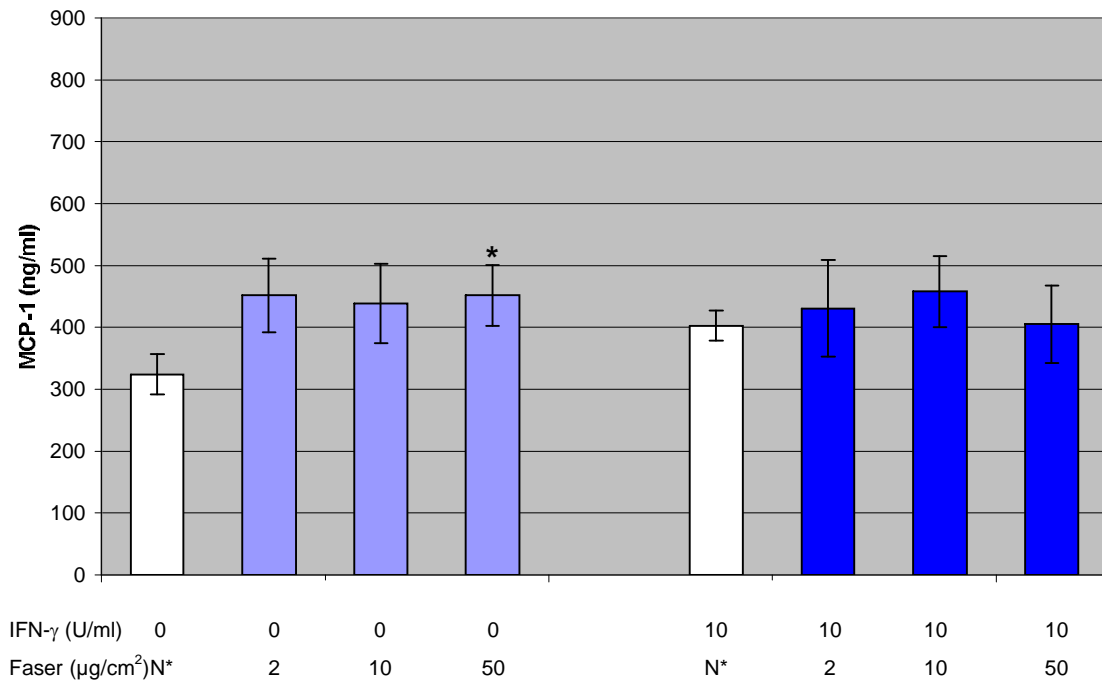
**Abbildung 26: Einfluß von Asbestfasern mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$  nach Stimulation von NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**

#### **3.3.1.4. Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von MCP-1 durch NR8383-Makrophagen**

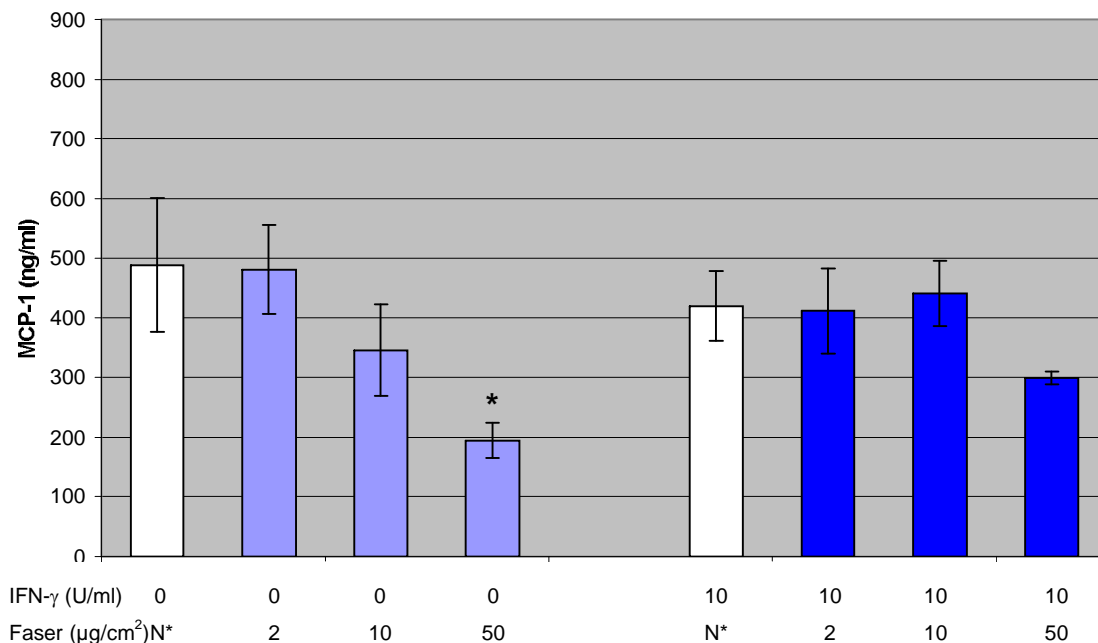
Die Makrophagen der Linie NR8383 zeichneten sich bereits durch eine starke Spontanproduktion von MCP-1 aus (vgl. Charakterisierung der Zellen, Kapitel 3.1.1.). Nach Stimulation mit Glaswolle ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) bzw. Asbest ( $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) konnte diese Freisetzung noch weiter gesteigert werden (Abbildungen 27 und 28). In der Kostimulation mit IFN- $\gamma$  wurde dieser Effekt aber aufgehoben. In Abbildung 29 ist die MCP-1-Freisetzung nach Stimulation der Zellen mit Steinwolle dargestellt. Hier konnte bei der isolierten Stimulation mit den Fasern ein hemmender Einfluß auf die Sekretion von MCP-1 bei einer Faser-Konzentration von  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  gezeigt werden. Auffällig war hier aber die im Vergleich zu den anderen Versuchsreihen deutlich gesteigerte MCP-1 Sekretion in der Negativkontrolle, die auf eine mögliche Kontamination hinweist. Aufgrund der hohen Spontansekretion bzw. der großen Schwankungsbreite der Konzentrationen von MCP-1 müssen die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden, so daß man bei Betrachtung aller Meßreihen nicht von einer signifikanten Beeinflussung der MCP-1-Sekretion von NR8383-Makrophagen durch die Partikel/Faserpräparationen ausgehen kann.



**Abbildung 27:** Einfluß von Glaswolle mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von MCP-1 nach Stimulation der NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.



**Abbildung 28:** Einfluß von Asbestfasern mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von MCP-1 nach Stimulation der NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.



**Abbildung 29: Einfluß von Steinwolle mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von MCP-1 nach Stimulation der NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**

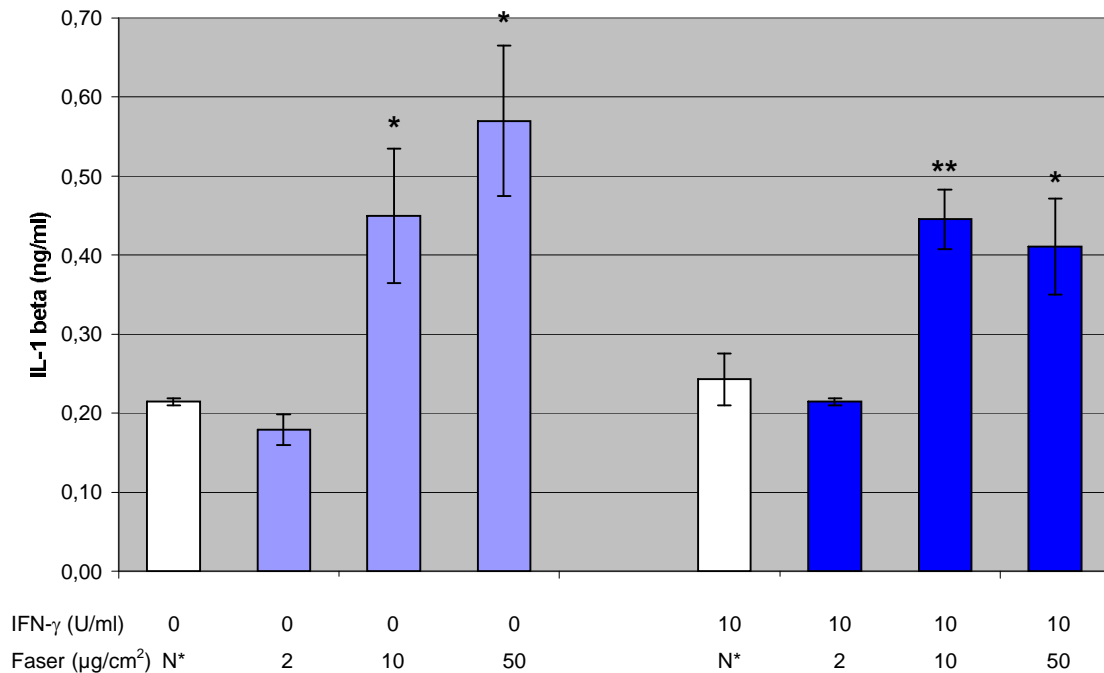
### 3.3.1.5. Einfluß der Fasen und Partikel auf die Freisetzung von IL-1 $\beta$ durch NR8383-Makrophagen

Titandioxid verursachte in den Konzentrationen von 10 und 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  einen Anstieg der IL-1 $\beta$ -Konzentration im Überstand (Abbildung 30). Der gleiche Effekt zeigte sich bei der Kostimulation mit IFN- $\gamma$ . Christobalit induzierte einen dosisabhängigen Anstieg der IL-1 $\beta$  Produktion ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Sowohl bei der isolierten Stimulation mit  $\alpha$ -Christobalit als auch in der Kombination mit IFN- $\gamma$  zeigte sich dieser Effekt (Abbildung 31). Keramikfasern führten in der Dosis von 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  zu einer Hemmung der IL-1 $\beta$ -Freisetzung (Abbildung 32). Dieser Effekt war in der Kostimulation nur noch tendenziell erkennbar. Bei Inkubation mit Glaswolle war kein statistisch signifikanter Einfluß auf die IL-1 $\beta$ -Freisetzung nachweisbar. In den Überständen von mit Steinwolle stimulierten Makrophagen fand sich eine deutliche Reduktion der Produktion von IL-1 $\beta$ . Dieser Effekt wurde auch bei Kostimulation mit IFN- $\gamma$  beobachtet (Abbildung 33). Ein hemmender Einfluß auf die Freisetzung dieses Mediators konnte auch für 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Asbest nach Kostimulation mit IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden (Abbildung 34).

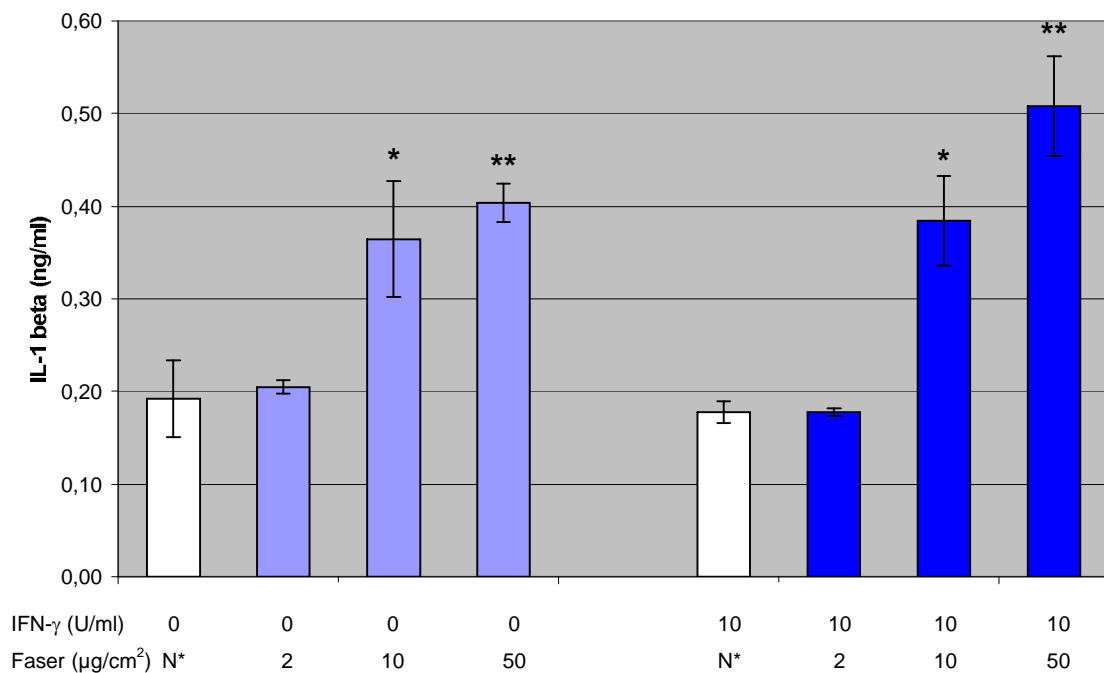
Auch diese Ergebnisse müssen vor einem besonderem Hintergrund betrachtet



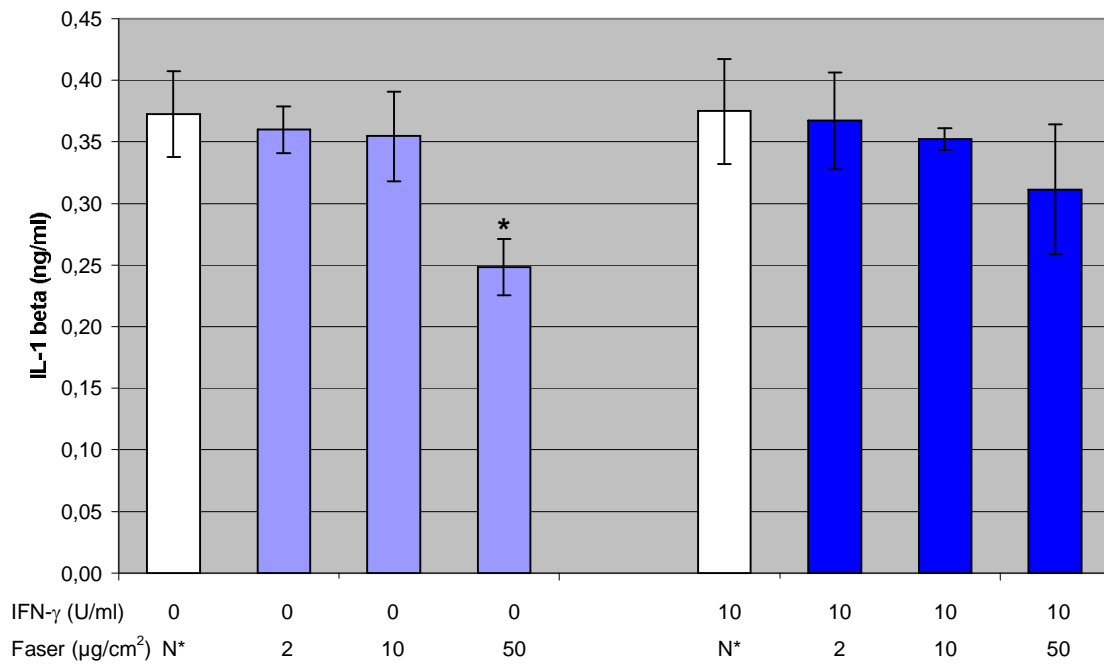
werden. Die gemessenen Konzentrationen von IL-1 $\beta$  befinden sich an der Sensitivitätsgrenze der eingesetzten Testsysteme, so daß bei den hier ermittelten Werten eine Stimulation bzw. Hemmung von IL-1 $\beta$  mit Vorsicht zu interpretieren ist.



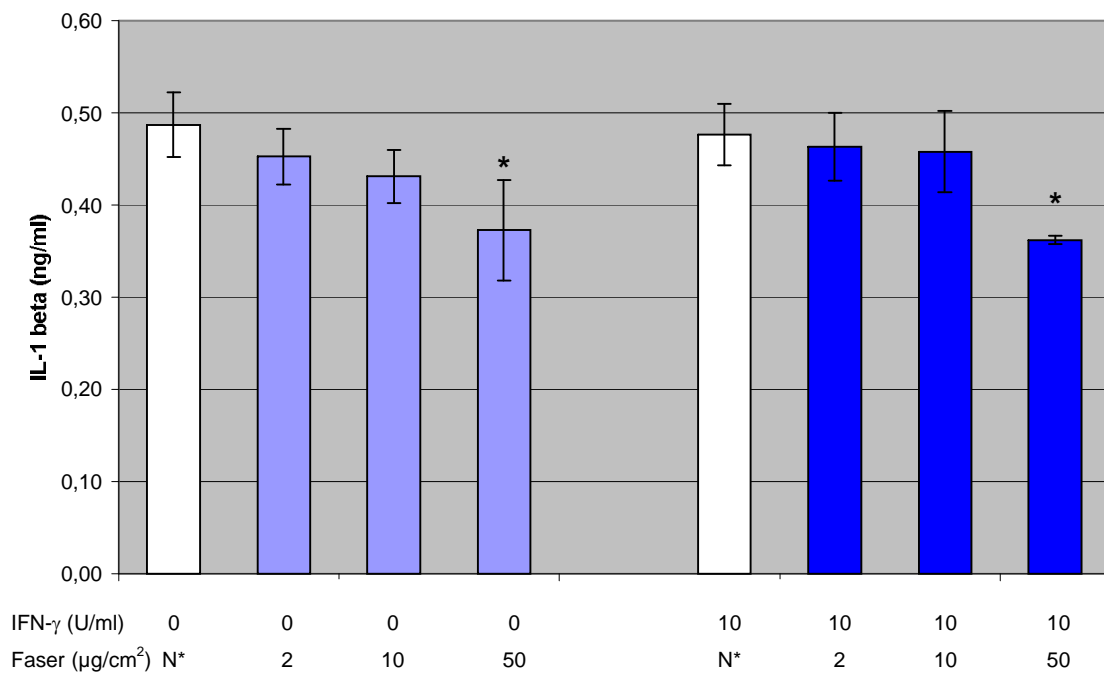
**Abbildung 30:** Einfluß von Titandioxid mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von IL-1 $\beta$  nach Stimulation der NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.



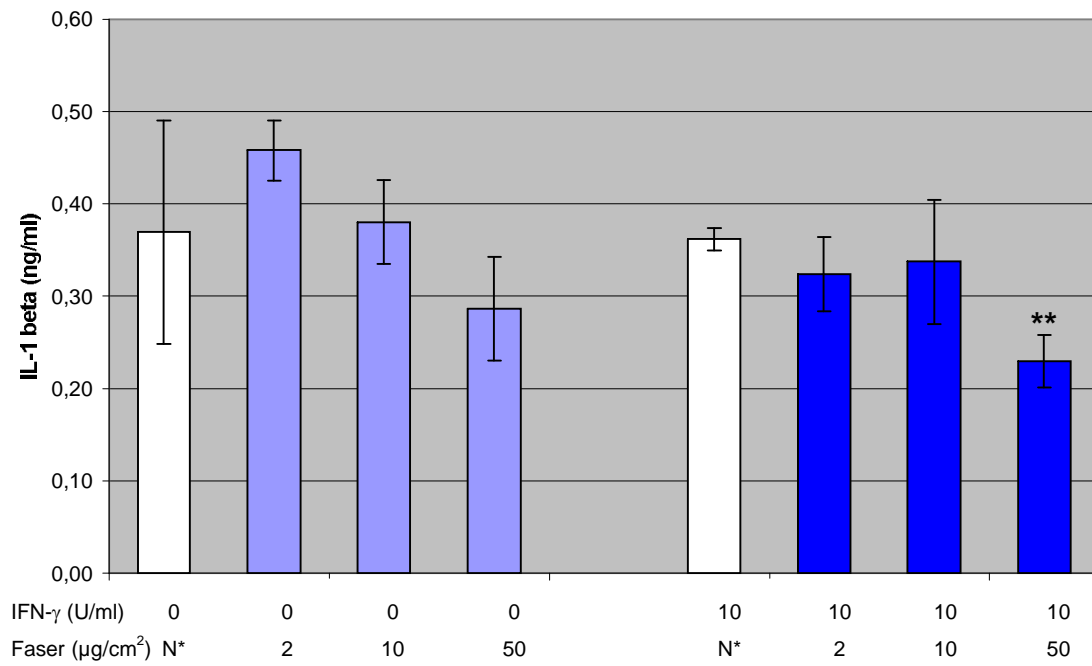
**Abbildung 31:** Einfluß von  $\alpha$ -Christobalit mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von IL-1 $\beta$  nach Stimulation der NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.



**Abbildung 32: Einfluß von Keramikfasern mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von IL-1 $\beta$  nach Stimulation der NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



**Abbildung 33: Einfluß von Steinwolle mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von IL-1 $\beta$  nach Stimulation der NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



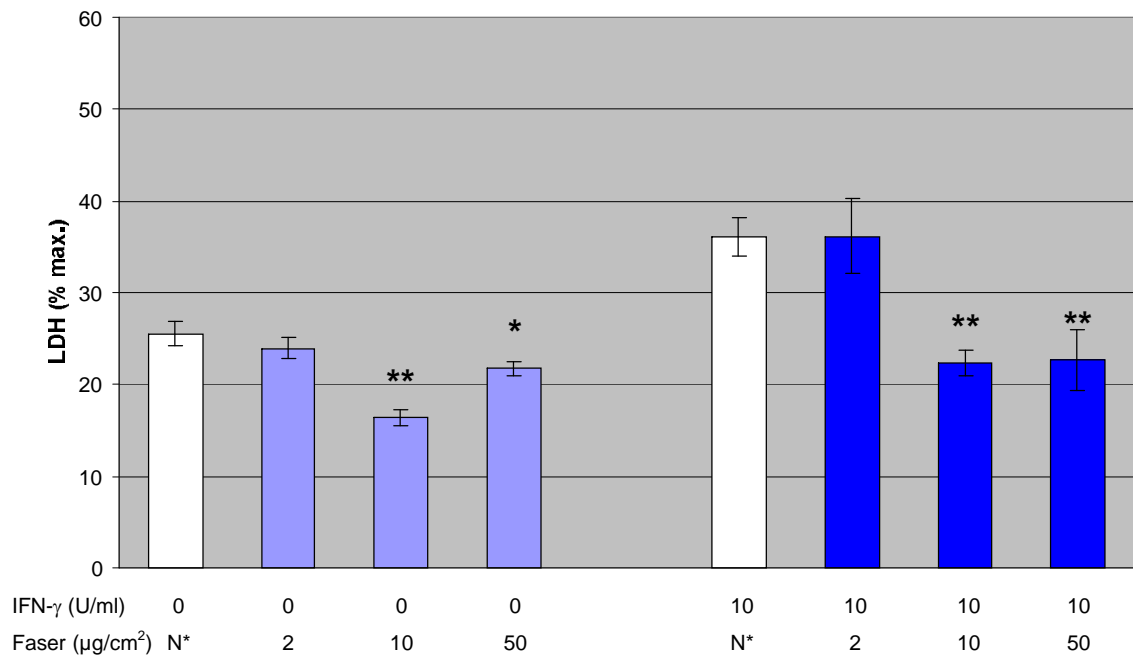
**Abbildung 34: Einfluß von Asbestfasern mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von IL-1 $\beta$  nach Stimulation der NR8383-Makrophagen für 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**

### **3.3.2. Stimulation der R2-Makrophagenzelllinie mit Fasern und Partikeln**

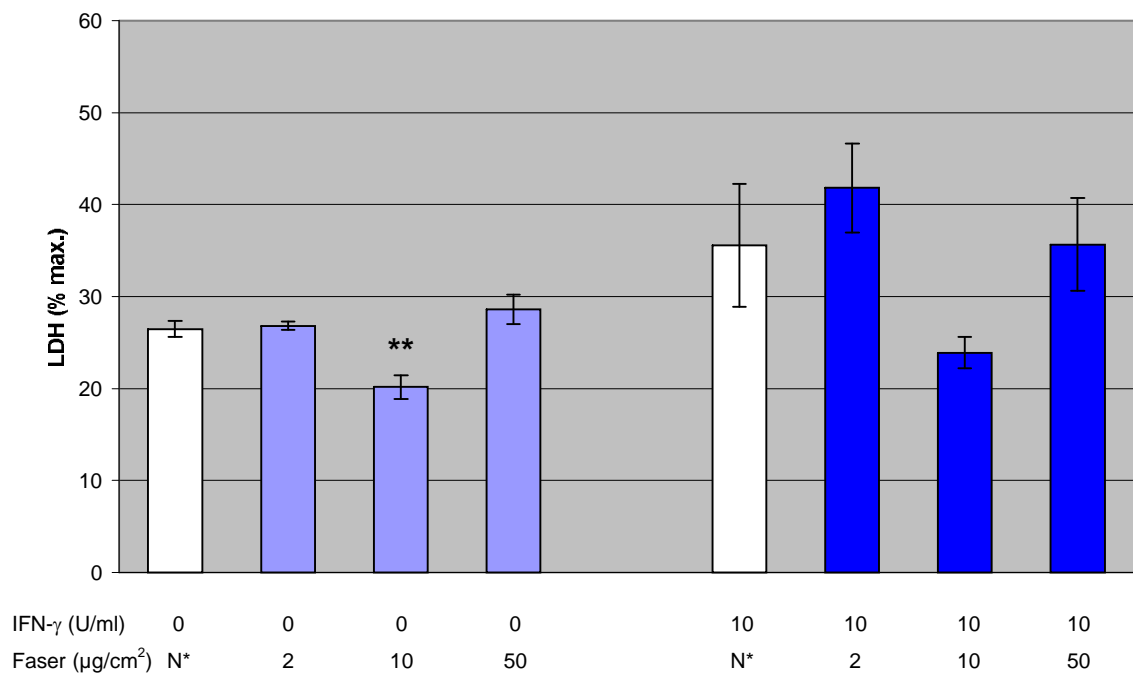
#### **3.3.2.1. Einfluß der Fasern und Partikel auf die LDH-Freisetzung durch R2-Makrophagen**

In diesem Versuch sollte ermittelt werden, welche der eingesetzten Konzentrationen der Fasern/Partikelpräparationen auf die Makrophagen bereits toxische Effekte hervorrufen. Es konnte gezeigt werden, daß die Stimulation der Zellen mit Titandioxid zu einer geringeren LDH-Freisetzung führt als in den entsprechenden Kontrollen. Ab einer Konzentration von  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  fiel die LDH-Konzentration sowohl nach Monostimulation als auch nach Kostimulation mit  $\text{IFN-}\gamma$  ab (Abbildung 35). Für  $\alpha$ -Christobalit konnte weder eine Zunahme noch eine Abnahme der Freisetzung von LDH nachgewiesen werden. Die verminderte LDH-Freisetzung bei  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  muß hier als statistischer Ausreißer gewertet werden (Abbildung 36). Keramikfasern verursachten nach Monostimulation in hohen Dosen vor allem aber auch nach Kostimulation mit  $\text{IFN-}\gamma$  eine reduzierte LDH-Konzentration im Überstand (Abbildung 37). In Abbildung 38 ist demonstriert, daß Glaswolle in der niedrigen Dosis von  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  eine Abnahme der LDH-Aktivität im Kulturüberstand induzierte. In der Kostimulation ließ sich ein solcher Effekt nicht nachweisen. Steinwolle führte in der isolierten Stimulation bei der Dosierung von  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  zu einem Anstieg der LDH (Abbildung 39). Besonders aber in der Kostimulation mit  $\text{IFN-}\gamma$  war dieser Effekt nachweisbar, der hier bereits ab einer Konzentration von  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  signifikant auftrat. Von allen Fasern führte nur die isolierte Verwendung von Asbest zu einem Anstieg der LDH auch in niedrigeren Konzentrationen. Bei der Kostimulation mit  $\text{IFN-}\gamma$  unterschied sich der LDH-Gehalt der Proben nicht von der Kontrolle (Abbildung 40).

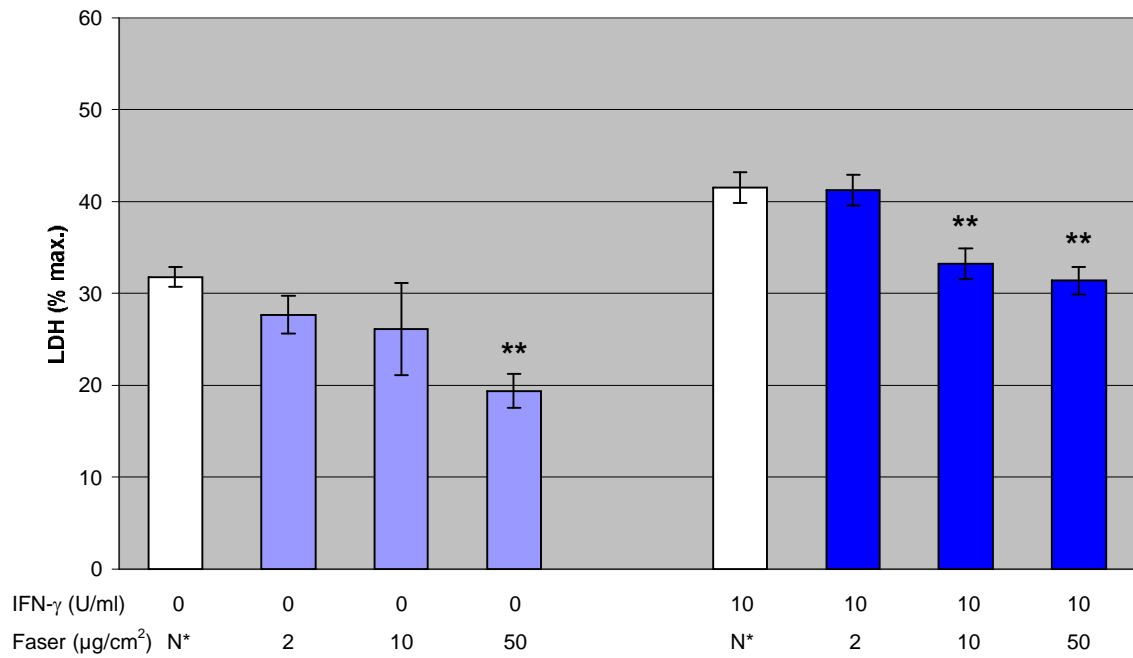
Zusammenfassend lässt sich sagen, daß die eingesetzten Faser-/Partikelpräparationen bis auf Asbest keinen eindeutigen Einfluß auf die Aktivität der LDH im Kulturüberstand hatten und somit keine Toxizität auf die R2-Makrophagen aufwiesen.



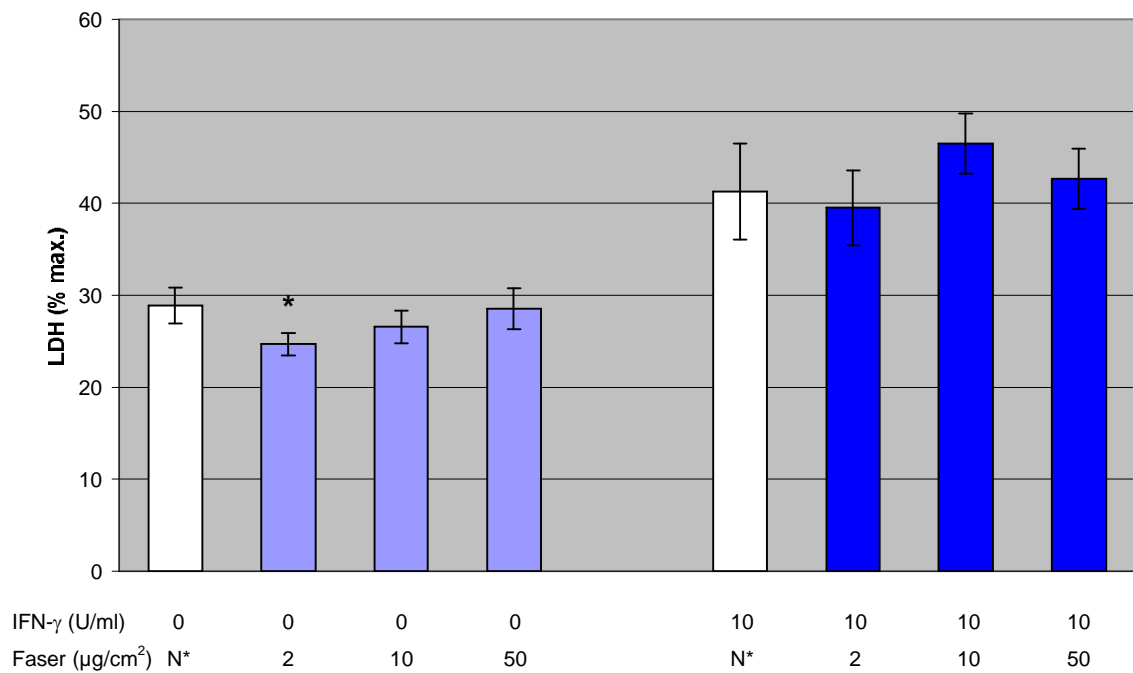
**Abbildung 35: Einfluß von Titandioxid mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von LDH aus R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



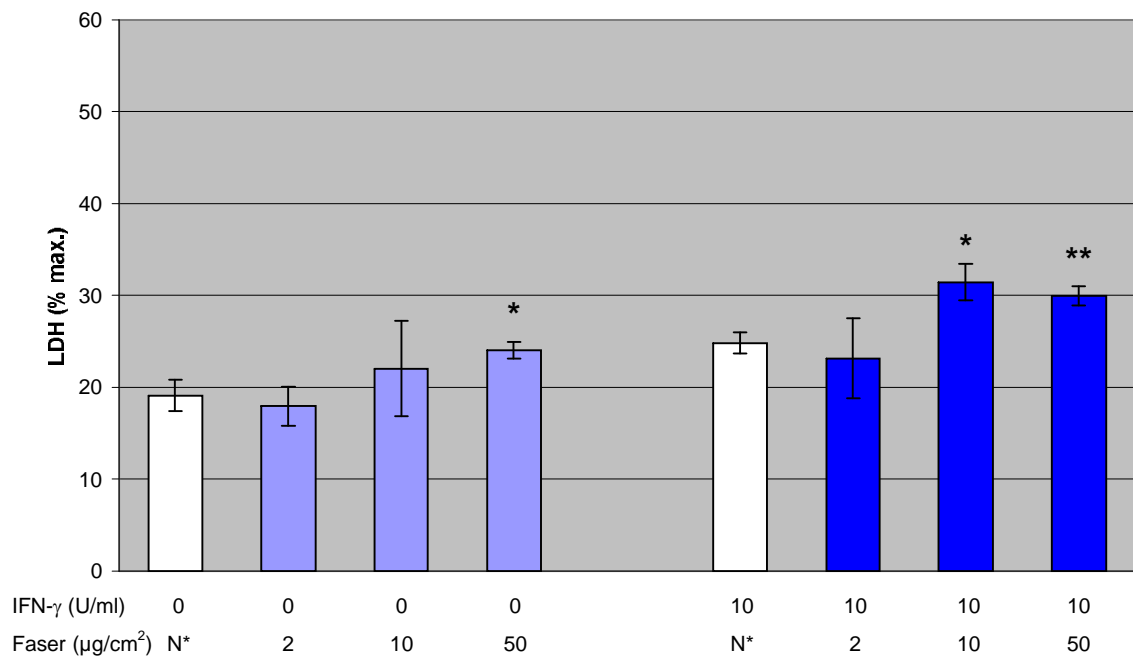
**Abbildung 36: Einfluß von  $\alpha$ -Christobalit mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von LDH aus R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



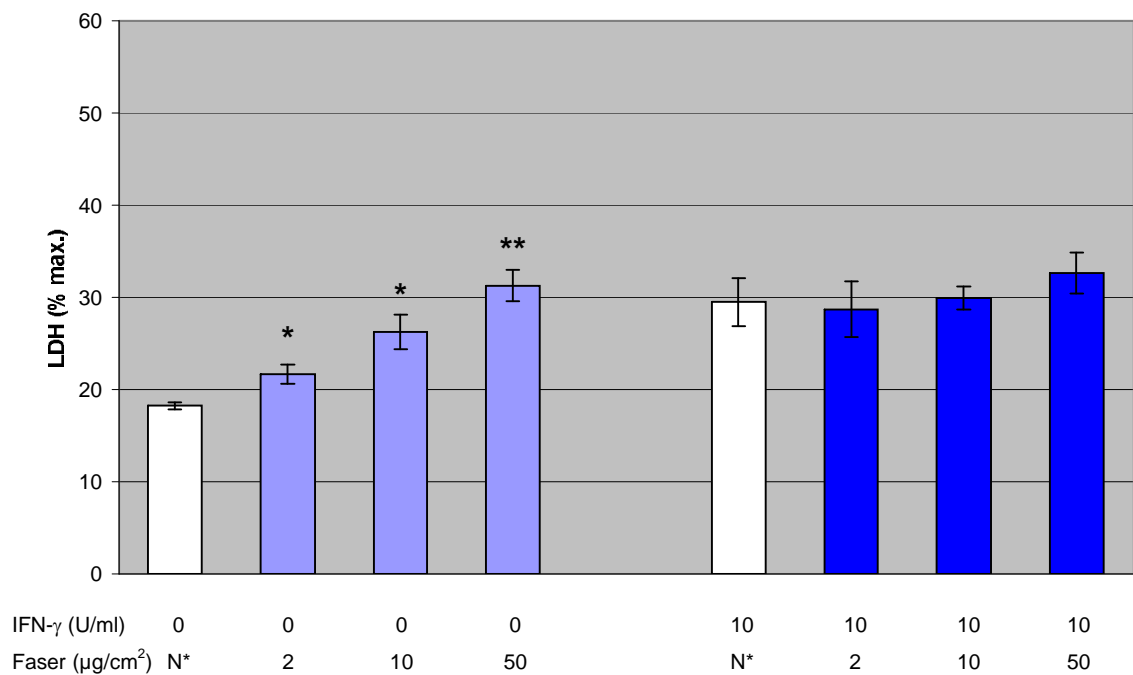
**Abbildung 37: Einfluß von Keramikfasern mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von LDH aus R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Fasernüberstand.**



**Abbildung 38: Einfluß von Glaswolle mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von LDH aus R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Fasernüberstand.**



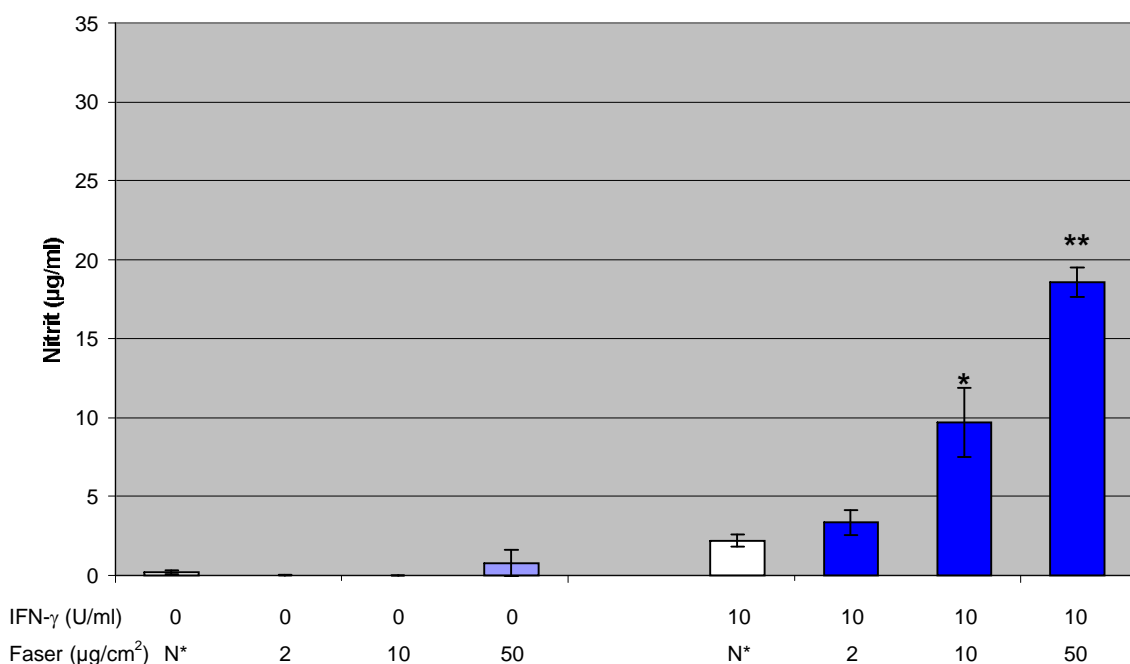
**Abbildung 39: Einfluß von Steinwolle mit und ohne IFN-γ auf die Freisetzung von LDH aus R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



**Abbildung 40: Einfluß von Asbestfasern mit und ohne IFN-γ auf die Freisetzung von LDH aus R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**

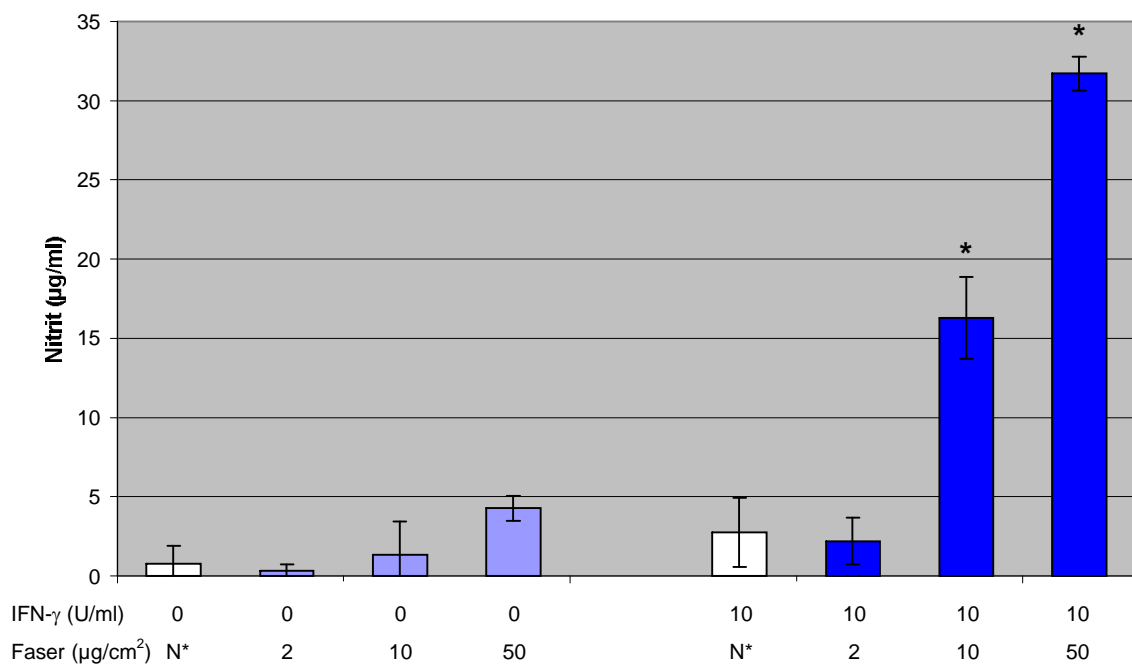
### 3.3.2.2. Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von NO durch R2-Makrophagen

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob R2-Makrophagen nach Stimulation mit den verwendeten anorganischen Materialien mit einer gesteigerten NO-Produktion reagieren. Ohne zusätzliche Stimulation mit IFN- $\gamma$  konnte nur bei 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$   $\alpha$ -Christobalit eine NO-Produktion induziert werden, alle anderen Fasern/Partikel verhielten sich hinsichtlich dieses Parameters inert. Es konnte gezeigt werden, daß die Kostimulation mit Titandioxid und IFN- $\gamma$  dosisabhängig zu einem Anstieg der Nitrit-Konzentration im Kulturüberstand führte (Abbildung 41). Auch bei der Kostimulation durch Christobalit und IFN- $\gamma$  kam es dosisabhängig zu einem Anstieg von NO im Überstand (Abbildung 42). Keramik und Glaswolle (Abbildung 43 und 44) führten nur in der hohen Dosierung von 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  in Kombination mit IFN- $\gamma$  zu einem messbaren Anstieg des Nitrits, welcher aber deutlich geringer als bei Titandioxid und  $\alpha$ -Christobalit ausfiel. Inkubation mit Steinwolle führte zu keiner Induktion der NO-Freisetzung. Asbest verhielt sich wie Titandioxid und Christobalit. In der Kostimulation mit IFN- $\gamma$  zeigte sich ein deutlicher dosisabhängiger Anstieg des Nitrits, der bei 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  signifikant erhöht war (Abbildung 45).

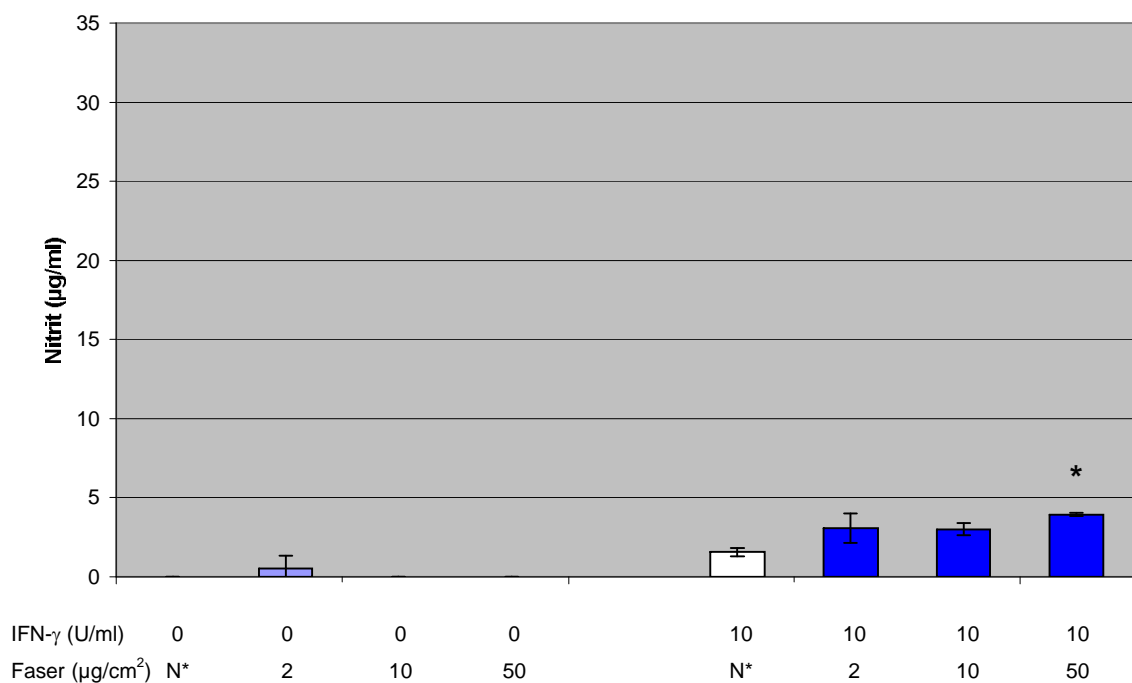


**Abbildung 41: Einfluß von Titandioxid mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von NO durch R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**

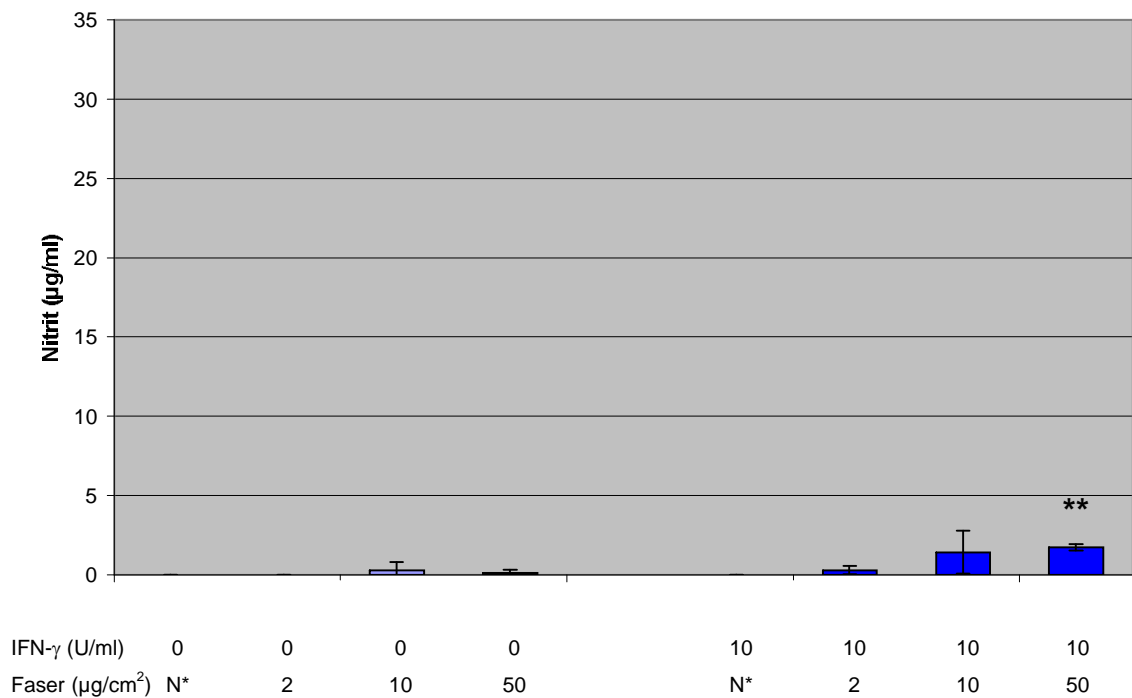




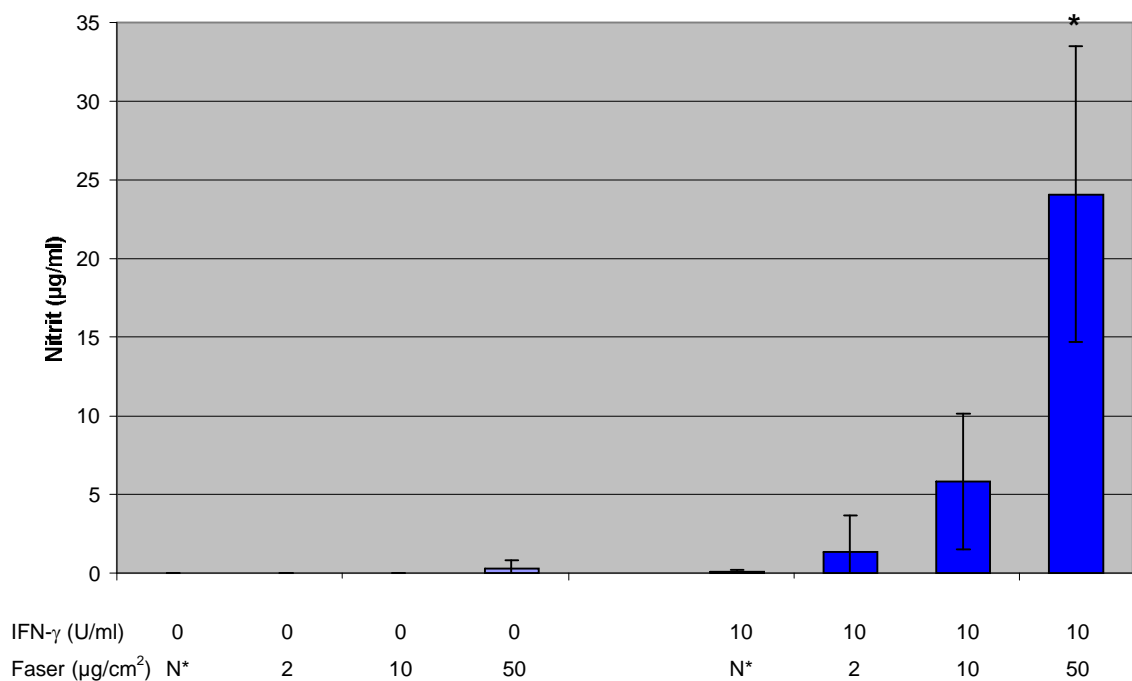
**Abbildung 42: Einfluß von  $\alpha$ -Christobalit mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von NO durch R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



**Abbildung 43: Einfluß von Keramikfasern mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von NO durch R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



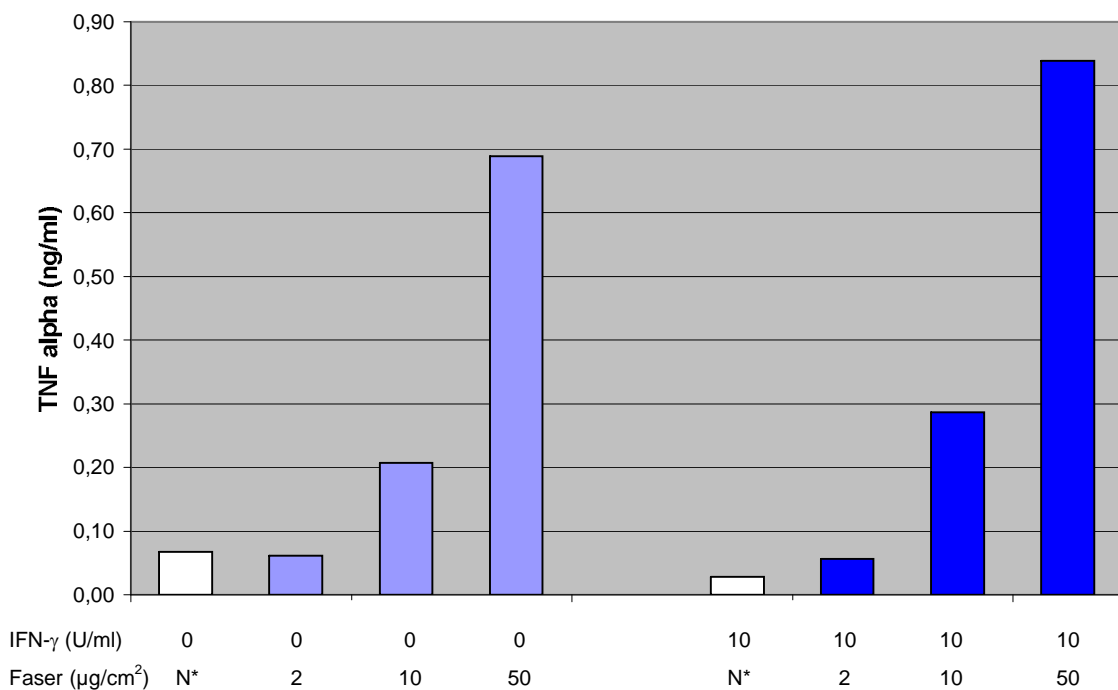
**Abbildung 44** Einfluß von Glaswolle mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von NO durch R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.



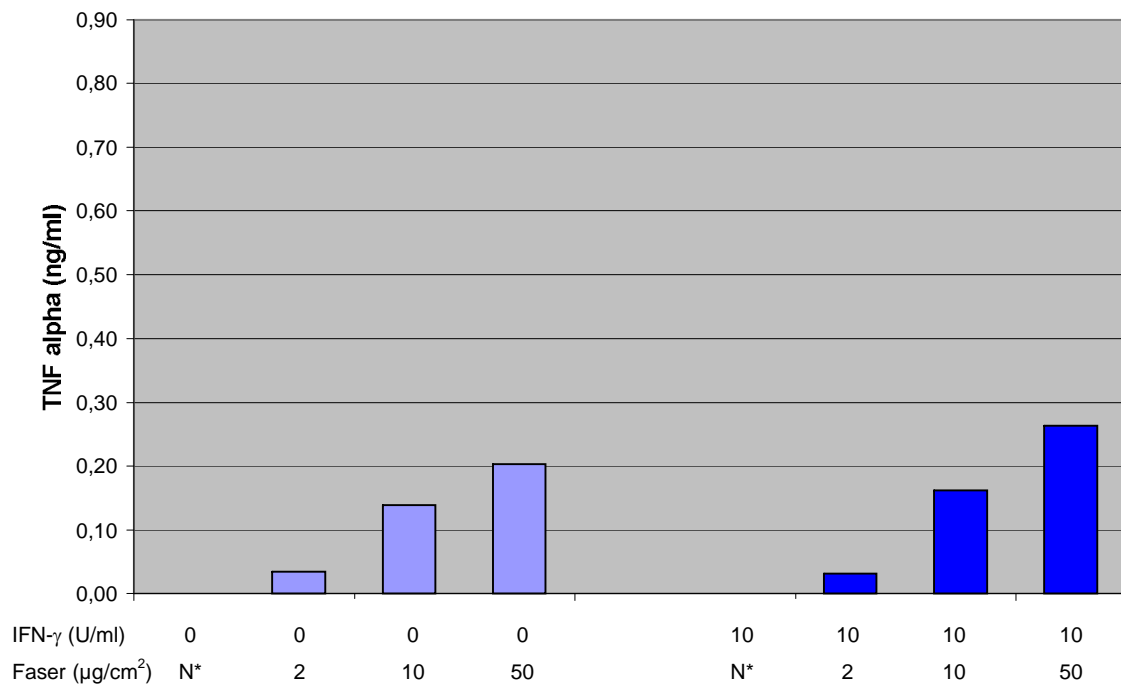
**Abbildung 45:** Einfluß von Asbestfasern mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von NO durch R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.

### 3.3.2.3. Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$ durch R2-Makrophagen

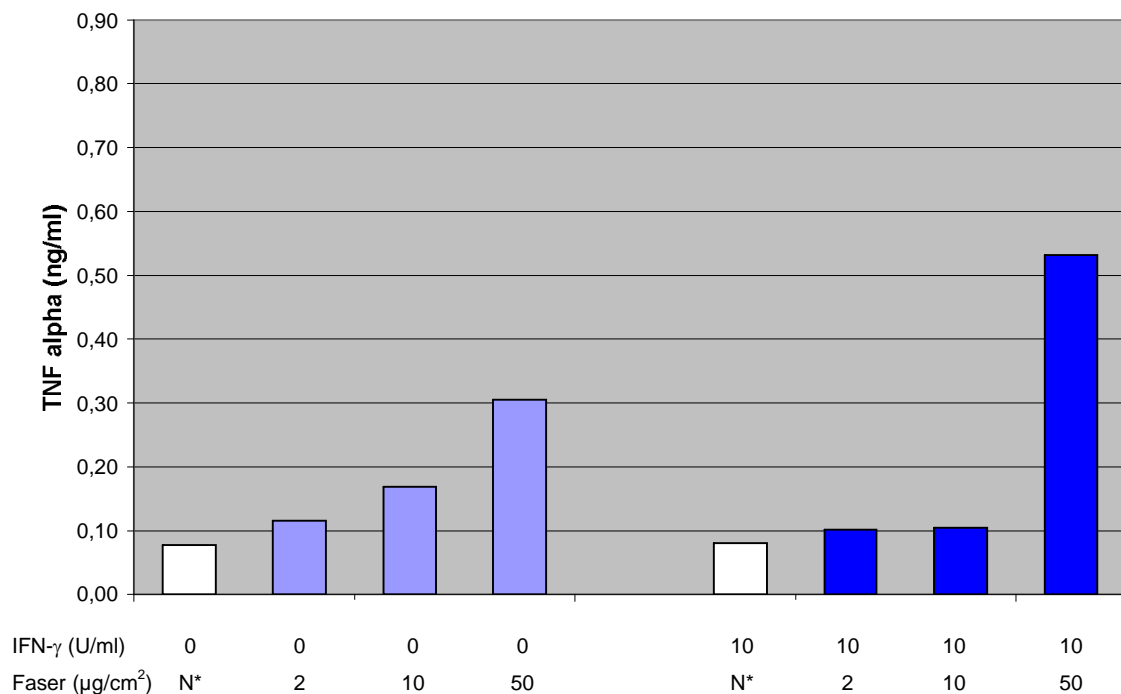
Die den folgenden Abbildungen zu Grunde liegenden Daten stammen aus Einfachbestimmungen, so daß hier nur Tendenzen beschrieben und keine Aussage über die statistische Signifikanz der Daten gemacht werden können. In Abbildung 46 ist zu erkennen, daß die Inkubation von R2-Zellen mit Titandioxid einen dosisabhängigen Anstieg der TNF- $\alpha$ -Freisetzung zur Folge hatte, der sowohl in der alleinigen Stimulation als auch in der Kostimulation mit IFN- $\gamma$  nachweisbar war. Sehr deutlich ließ sich dieser Effekt auch bei Inkubation der Zellen mit Christobalit und Asbest nachweisen (Abbildung 47 und 48). Keramikfasern, Glaswolle und Steinwolle hatten keinen Einfluß auf die TNF- $\alpha$ -Produktion von R2-Makrophagen, weder alleine noch in der Kombination mit IFN- $\gamma$ .



**Abbildung 46: Einfluß von Titandioxid mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$  durch R2-Makrophagen Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



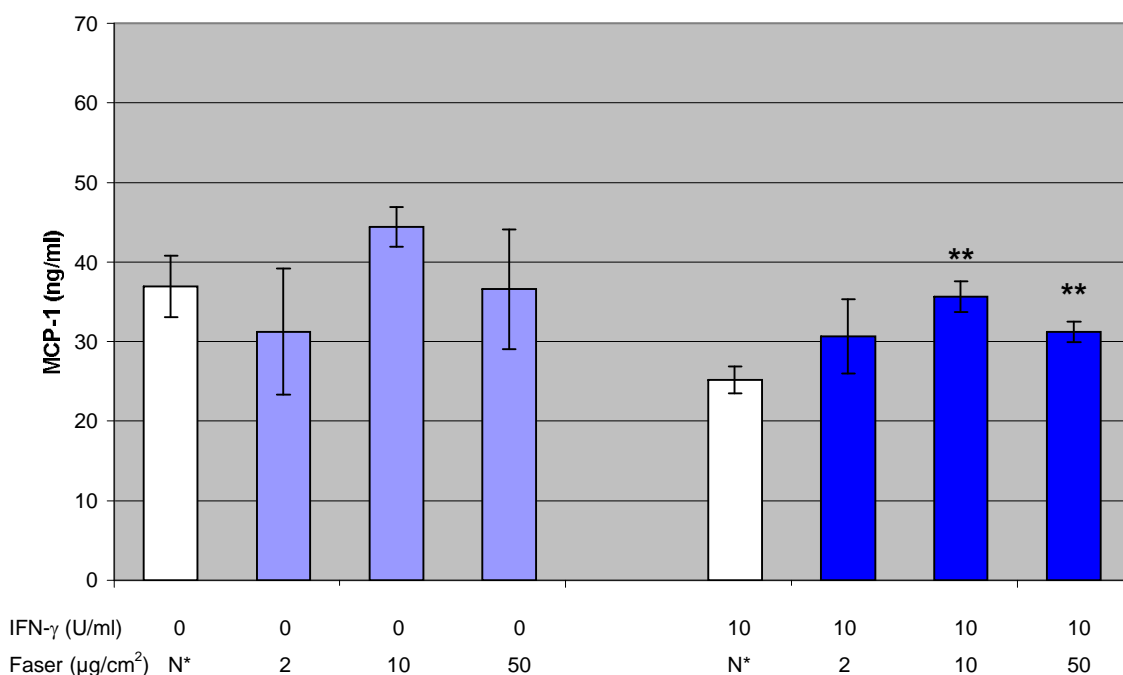
**Abbildung 47: Einfluß von  $\alpha$ -Christobalit mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung durch TNF- $\alpha$  aus R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



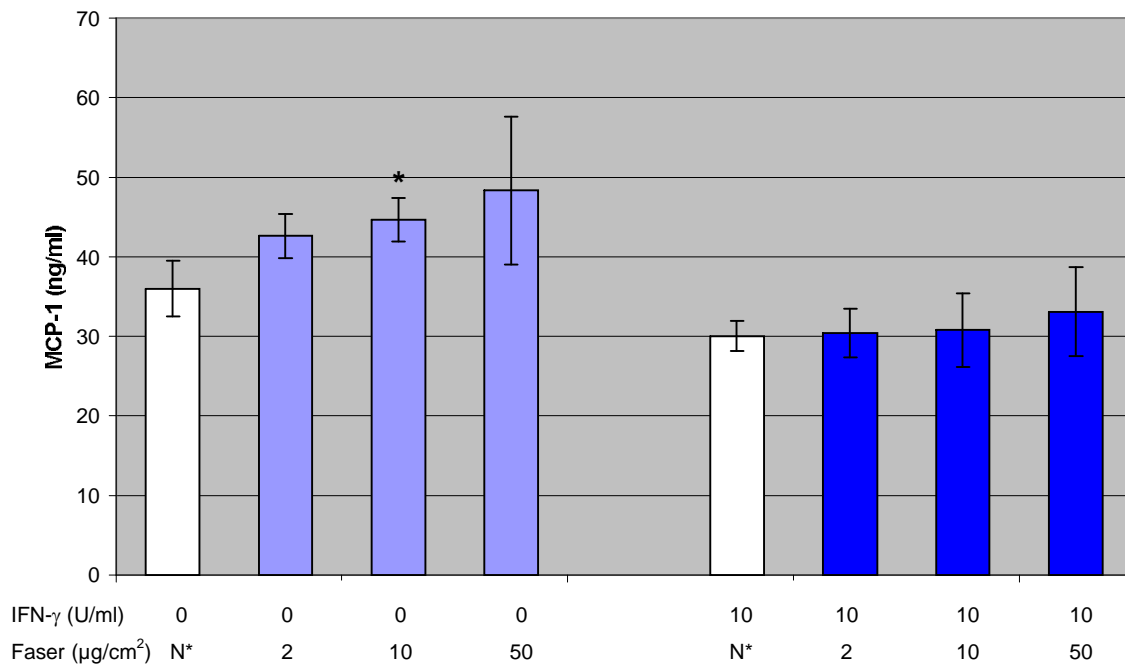
**Abbildung 48: Einfluß von Asbestfasern mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$  durch R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**

### 3.3.2.4. Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von MCP-1 durch R2-Makrophagen

Ziel dieser Versuchsreihe war es herauszufinden, ob die Freisetzung von MCP-1 durch Stimulation von R2-Makrophagen mit Fasern und Partikeln beeinflusst werden kann. Titandioxid, Christobalit, Keramik und Glaswolle hatten sowohl allein als auch in der Kombination mit IFN- $\gamma$  keinen Einfluß auf die Freisetzung von MCP-1. Abbildung 49 stellt die MCP-1-Konzentration im Kulturüberstand nach Exposition mit Steinwolle dar. In der Kombination mit IFN- $\gamma$  kam es in den Konzentrationen 10 und 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  zu einer leicht gesteigerten Freisetzung von MCP-1 durch die Zellen. Bei Asbest (Abbildung 50) wurde nach Stimulation ohne IFN- $\gamma$  ein dosisabhängiger Anstieg von MCP-1 beobachtet, der nach Kostimulation mit IFN- $\gamma$  allerdings nicht mehr nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 49: Einfluß von Steinwolle mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von MCP-1 aus R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**

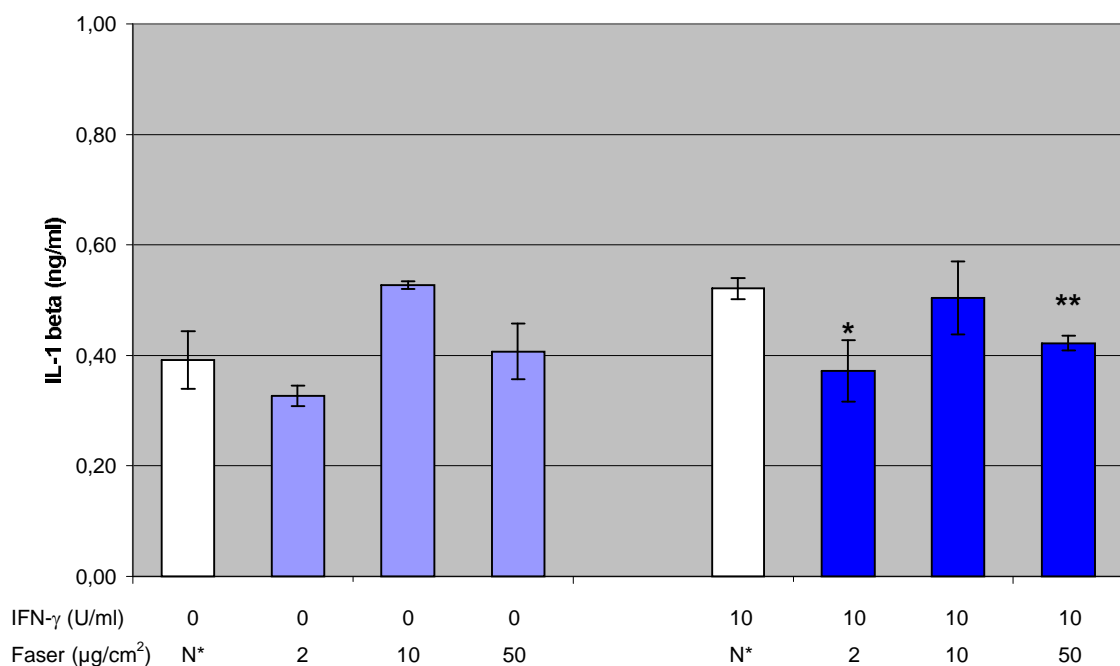


**Abbildung 50: Einfluß von Asbestfasern mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von MCP-1 aus R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**

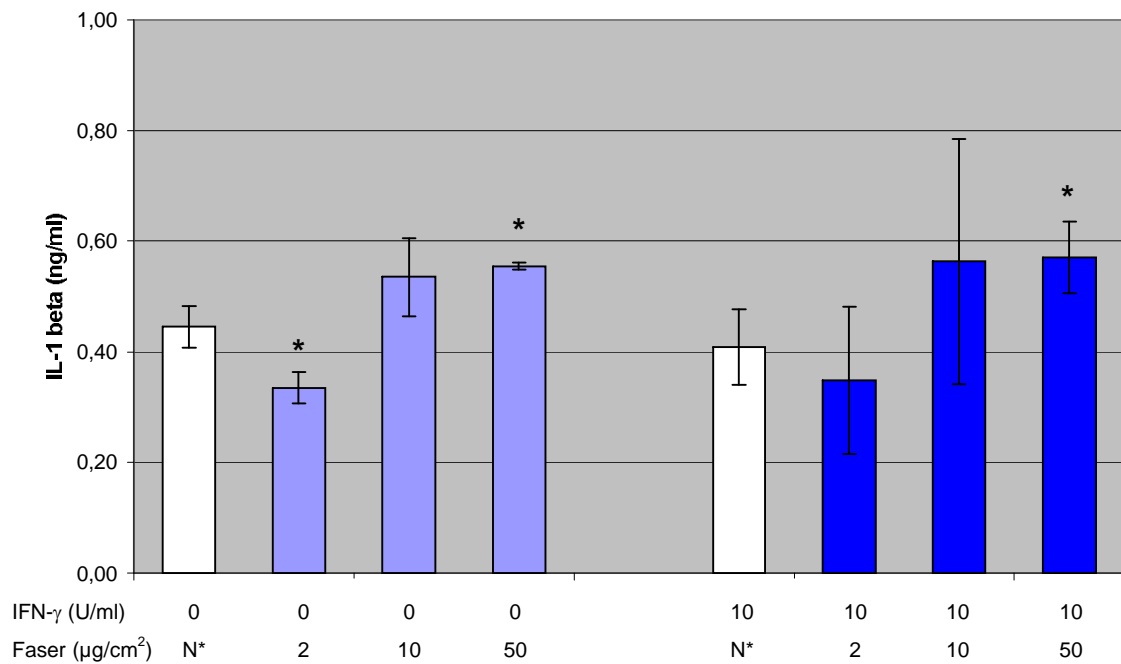
### 3.3.2.5. Einfluß der Fasern und Partikeln auf die Freisetzung von IL-1 $\beta$ durch R2-Makrophagen

Von IL-1 $\beta$  weiß man, daß es in der Pathogenese der Silikose eine Rolle spielt. Unklar war allerdings der Effekt anderer mineralischer Fasern auf die Produktion dieses Zytokins. Wenn die R2-Makrophagen mit Titandioxid und IFN- $\gamma$  stimuliert wurden, kam es in den Konzentrationen 2 und 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  zu einer leichten Hemmung der IL-1 $\beta$ -Produktion. Die Exposition nur mit Titandioxid ergab uneinheitliche, nicht signifikante Befunde (Abbildung 51). Im Kulturüberstand von mit  $\alpha$ -Christobalit exponierten Zellen wurde bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ebenfalls eine leichte Hemmung der IL-1 $\beta$ -Produktion beobachtet. Diese war in der Kostimulation mit IFN- $\gamma$  aber nicht mehr signifikant. Im Gegensatz dazu kam es bei einer Dosierung von 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  sowohl bei der alleinigen Stimulation als auch in der Kombination mit IFN- $\gamma$  zu einer gesteigerten Freisetzung von IL-1 $\beta$  (Abbildung 52). Wenn die Makrophagen mit Keramikfasern und Glaswolle inkubiert wurden, war im Vergleich zu den Kontrollen keine signifikante Veränderung der IL-1 $\beta$ -Produktion nachweisbar. Steinwolle führte, wie auch Titandioxid, sowohl

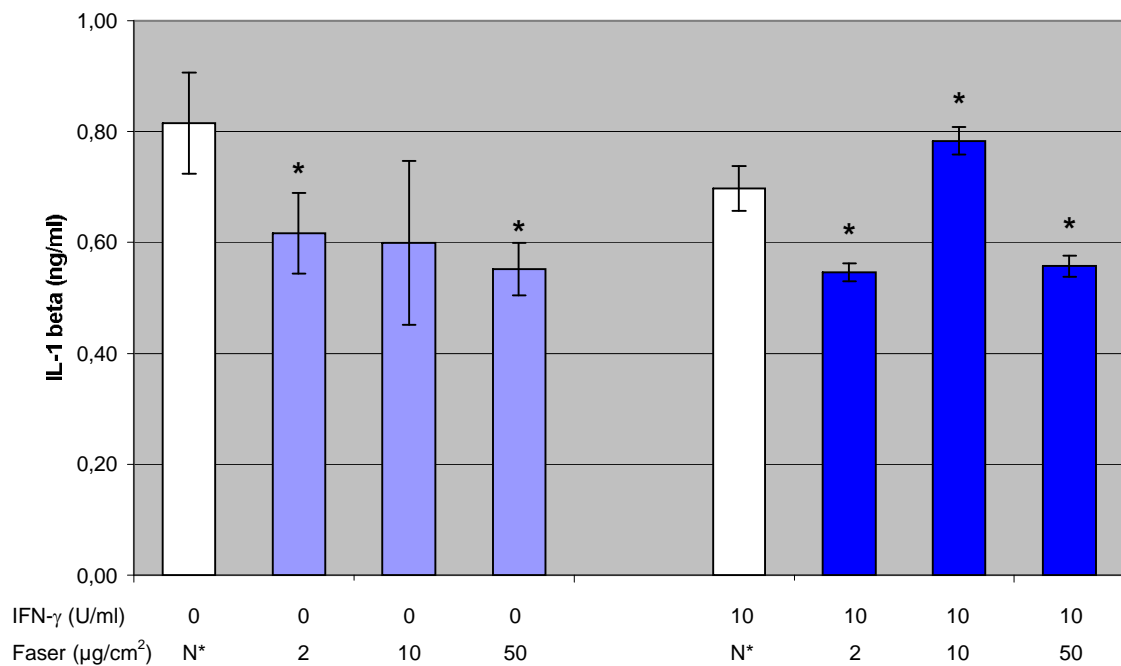
bei der alleinigen Stimulation als auch in der kombinierten Exposition mit IFN- $\gamma$  bei 2 und 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  zu einem Abfall der IL-1 $\beta$ -Freisetzung durch R2-Makrophagen. Wenn 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Steinwolle mit IFN- $\gamma$  eingesetzt wurden, zeigte sich dagegen ein Anstieg der IL-1 $\beta$ -Produktion (Abbildung 53). Asbest führte in allen Dosen zu einer signifikanten Reduktion der IL-1 $\beta$ -Freisetzung. Dieser Effekt wurde durch gleichzeitige Gabe von IFN- $\gamma$  allerdings wieder aufgehoben (Abbildung 54).



**Abbildung 51: Einfluß von Titandioxid mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Produktion von IL-1 $\beta$  durch R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**

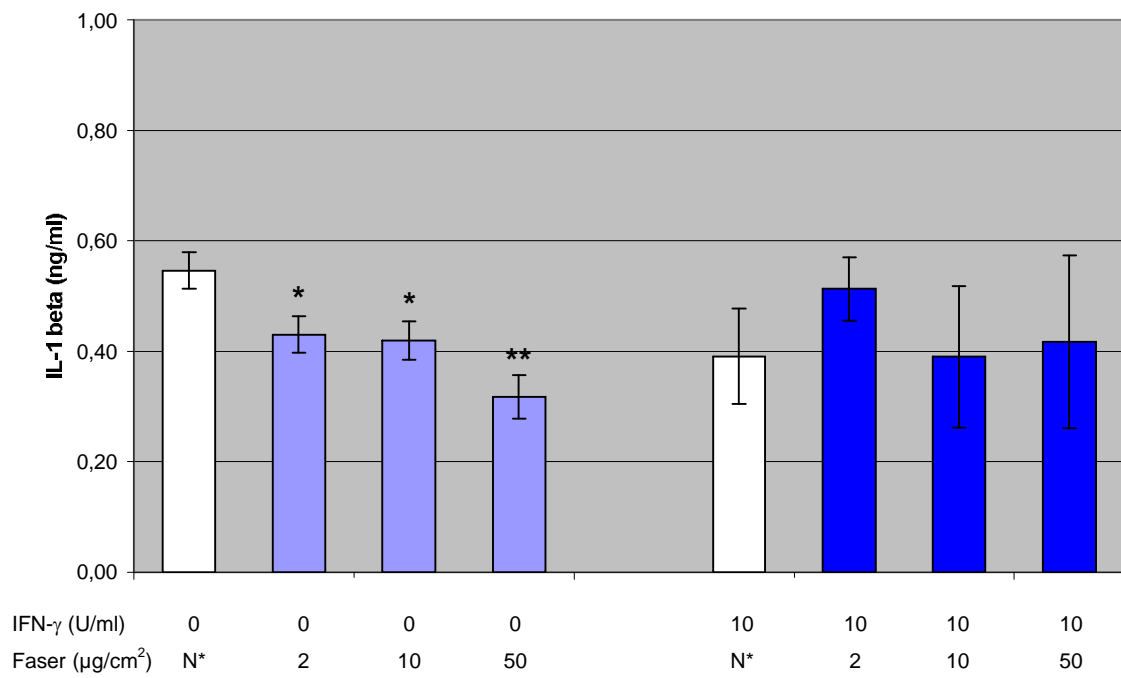


**Abbildung 52: Einfluß von  $\alpha$ -Christobalit mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Produktion von IL-1 $\beta$  durch R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



**Abbildung 53: Einfluß von Steinwolle mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Produktion von IL-1 $\beta$  durch R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**





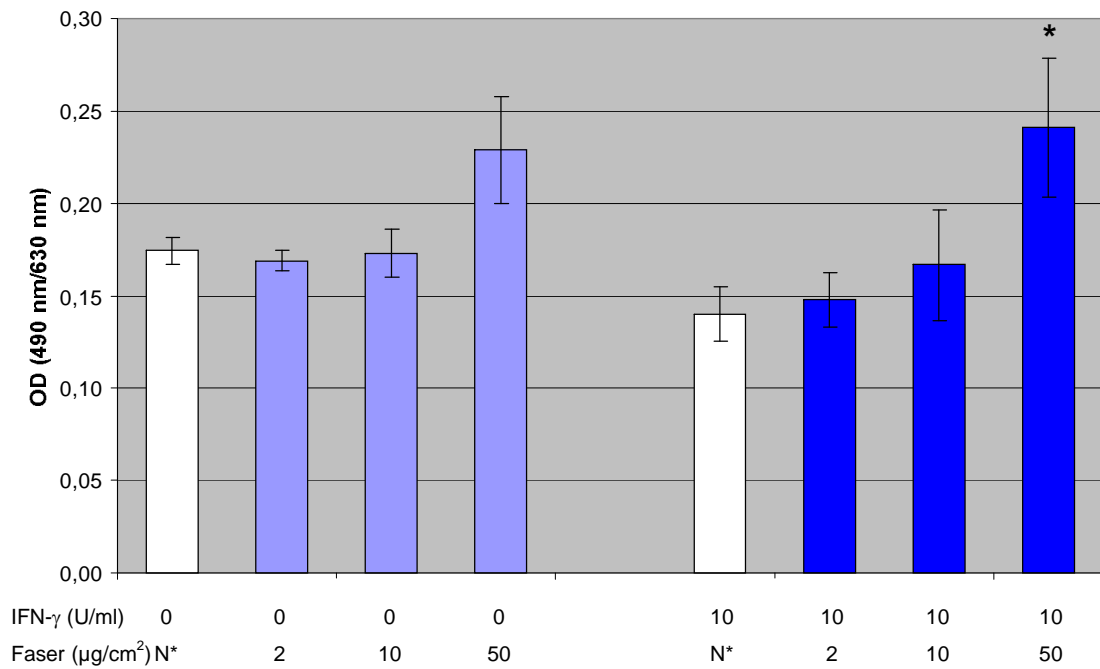
**Abbildung 54: Einfluß von Asbestfasern mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Produktion von IL-1 $\beta$  durch R2-Makrophagen. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**

### **3.3.3. Stimulation primärer humaner Monozyten**

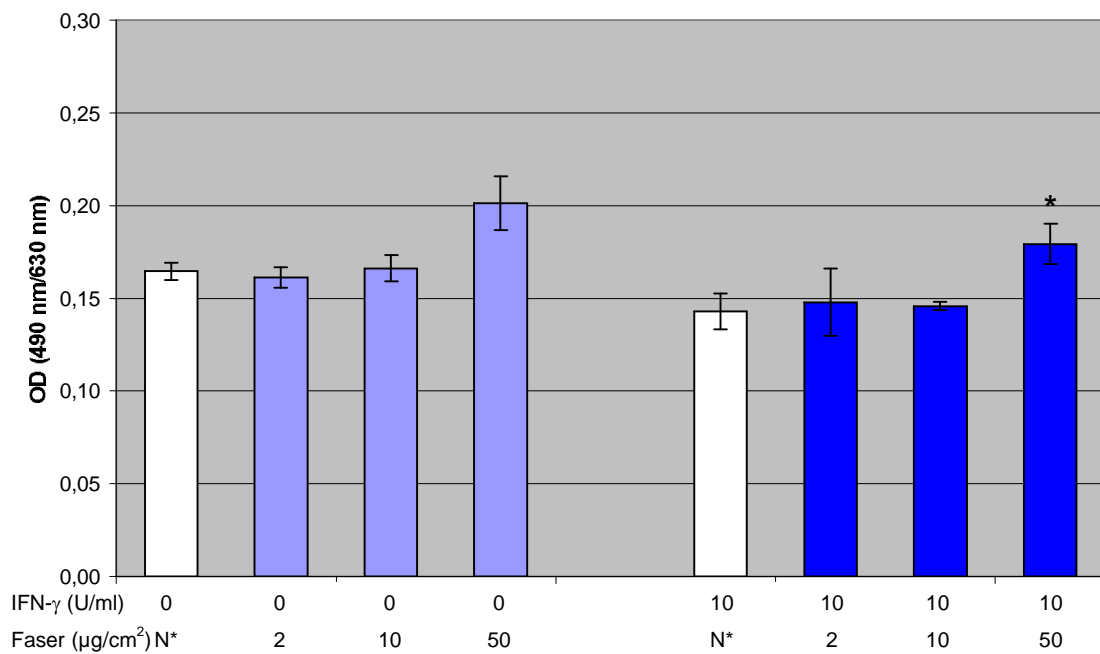
Mit der im folgenden beschriebenen Untersuchung sollte gezeigt werden, ob sich die Ergebnisse, die mit der Hilfe von Zelllinien gewonnen wurden, auch auf primäre menschliche Zellen übertragen lassen. Dazu wurden humane Monozyten wie bereits beschrieben präpariert, stimuliert und die Überstände im Anschluß an eine 24-stündige Inkubation mit den beschriebenen Stimuli hinsichtlich des Gehalts an LDH, Nitrit, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und MCP-1 untersucht.

#### **3.3.3.1. Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von LDH durch humane Monozyten**

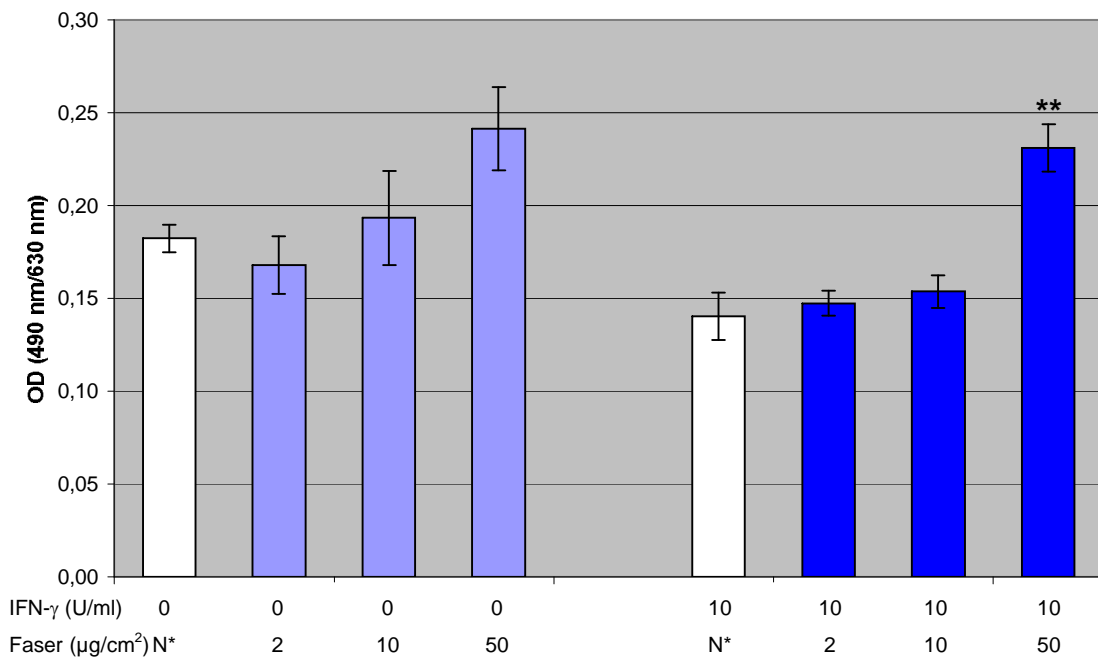
Auch für humane Monozyten wurde zunächst die Konzentration der LDH im Überstand ermittelt, um eine Aussage über die Toxizität der Materialien auf diese Zellen treffen zu können. Auf eine relative Darstellung in Bezug auf die LDH<sub>100</sub> wurde verzichtet, da hierfür große Mengen an Zellen hätten eingesetzt werden müssen. Dafür wurde hier die photometrisch ermittelte optische Dichte (OD 490 nm/630 nm) des umgesetzten Substrats aufgetragen, die in Abhängigkeit von der LDH-Konzentration einen linearen Verlauf aufweist. Es zeigte sich, daß Titandioxid,  $\alpha$ -Christobalit und Asbest in der Kostimulation mit IFN- $\gamma$  ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  zu einem signifikanten Anstieg der LDH führten (Abbildungen 55 - 57). Nach alleiniger Stimulation mit den Fasern kam es ebenfalls zu einer Erhöhung der Enzymaktivität, allerdings war diese geringer ausgeprägt. Keramik, Glaswolle und Steinwolle hatten weder in der Monostimulation noch in der Kostimulation einen signifikanten Einfluß auf die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand.



**Abbildung 55: Einfluß von Titandioxid mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von LDH durch humane Monozyten. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



**Abbildung 56 : Einfluß von  $\alpha$ -Christobalit mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von LDH durch humane Monozyten. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**

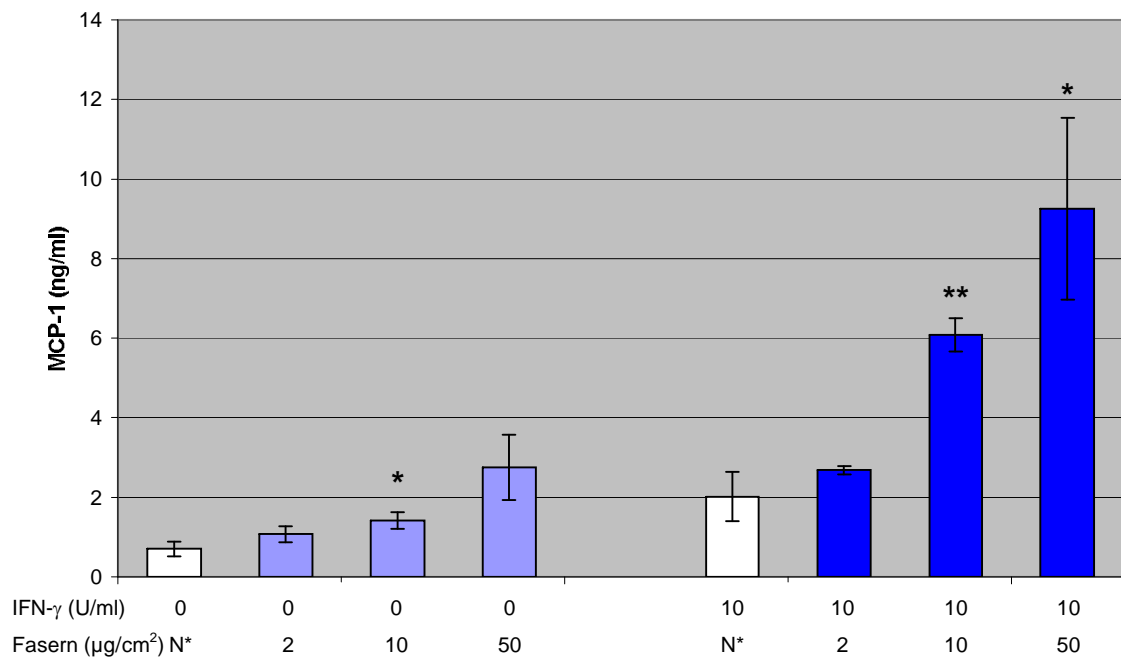


**Abbildung 57: Einfluß von Asbestfasern mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von LDH durch humane Monozyten. Messung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**

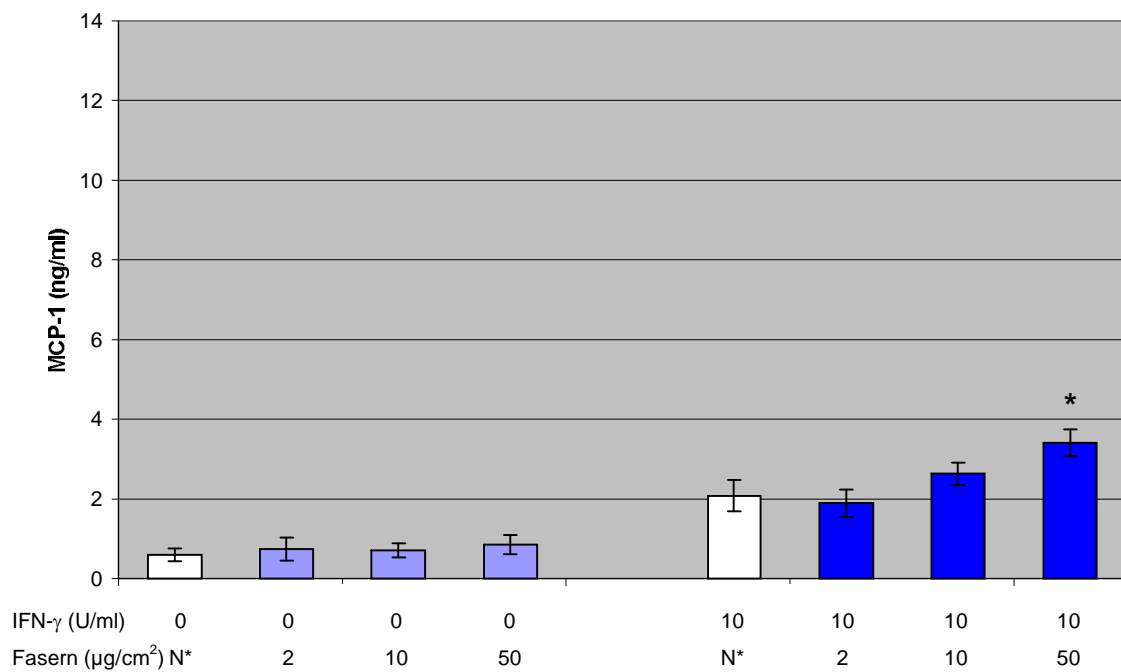
### 3.3.3.2. Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von MCP-1 durch humane Monozyten

Monozyten zeigten in den Vorversuchen (nicht abgebildet) eine deutliche Freisetzung von MCP-1 nach Stimulation mit Endotoxin. Diese wurde von der kombinierten Stimulation mit LPS und IFN- $\gamma$  noch übertroffen. Im folgenden wurde die Veränderung der Produktion von MCP-1 nach Stimulation der Zellen mit den Faser-/Partikelpräparationen untersucht. Die Abbildung 58 zeigt die Reaktion der Monozyten in Bezug auf die MCP-1-Freisetzung nach Stimulation mit Titandioxid. Nach isolierter Gabe kam es zu einem dosisabhängigen Anstieg der MCP-1-Konzentration im Überstand, der Unterschied war bei 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  signifikant. Nach Kostimulation mit IFN- $\gamma$  wurde dieser Anstieg noch deutlicher beobachtet.

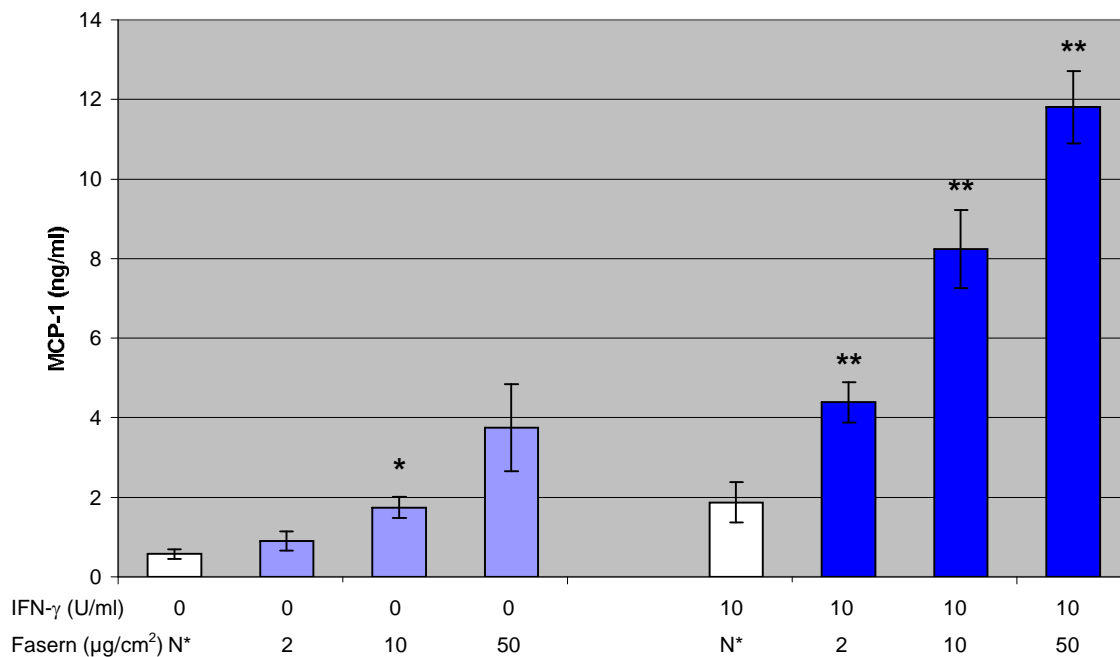
Christobalit und Asbest (Abbildungen 59 und 60) verhielten sich wie Titandioxid. Nur die absolut freigesetzten Mengen an MCP-1 unterschieden sich (Asbest>Titandioxid>Christobalit). Keramik, Glaswolle und Steinwolle hatten keinen Einfluß auf die Freisetzung von MCP-1.



**Abbildung 58: Einfluß von Titandioxid mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Produktion von MCP-1 von humanen Monozyten. Bestimmung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



**Abbildung 59: Einfluß von  $\alpha$ -Christobalit mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Produktion von MCP-1 von humanen Monozyten. Bestimmung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**



**Abbildung 60: Einfluß von Asbestfasern mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Produktion von MCP-1 von humanen Monozyten. Bestimmung nach 24 Stunden. N\* = Faserüberstand.**

### 3.3.3.3. Einfluß der Fasern und Partikel auf die Freisetzung von NO, TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$ durch humane Monozyten

Nitrit und TNF- $\alpha$  waren weder nach der isolierten Stimulation mit den Fasern/Partikeln noch nach Kostimulation mit IFN- $\gamma$  in mit den verwandten Methoden meßbaren Konzentrationen vorhanden. IL-1 $\beta$  wurde zwar von den Monozyten in nachweisbaren Konzentrationen produziert, diese Freisetzung wurde aber durch die Stimulation mit Fasern/Partikeln (mit und ohne Kostimulation mit IFN- $\gamma$ ) nicht in signifikanter Weise beeinflusst. In den Vorversuchen konnte allerdings eine Induktion der TNF- $\alpha$ -und IL-1 $\beta$ -Produktion in Abhängigkeit von LPS und IFN- $\gamma$  gezeigt werden. Nitrit als ein Endprodukt der NO-Synthese war mittels der Griess-Reaktion unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar.

### 3.4. Stimulation der Makrophagen mit identischer Faser-/Partikelzahl

Wie bereits im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, zeichnen sich die eingesetzten Fasern/Partikel durch einen ausgeprägten Größenunterschied aus. Die mikroskopische Analyse der Makrophagen zeigte, wie unterschiedlich sich die Interaktion der Zellen mit diesen verschiedenen Materialien darstellte. Die folgenden Abbildungen wurden nach 24-stündiger Inkubation von R2-Makrophagen mit  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  der entsprechenden Fasern/Partikel aufgenommen. Die Abbildungen zeigen deutlich, daß alle Substanzen durch Makrophagen phagozytiert wurden. Abbildung 61 zeigt die R2-Makrophagen nach Inkubation mit Titandioxid. Die Fasern sind fast komplett von den Zellen aufgenommen worden. Diese sind zum Teil vollständig mit Titandioxid gefüllt ( $\leftarrow$ ).

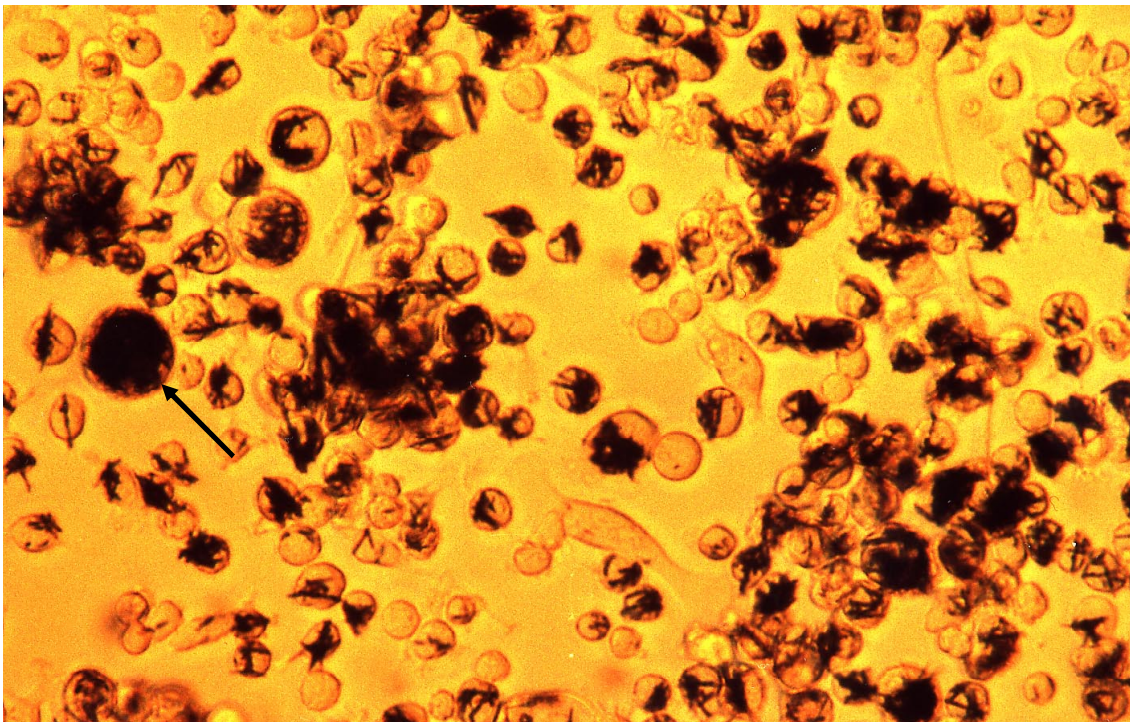
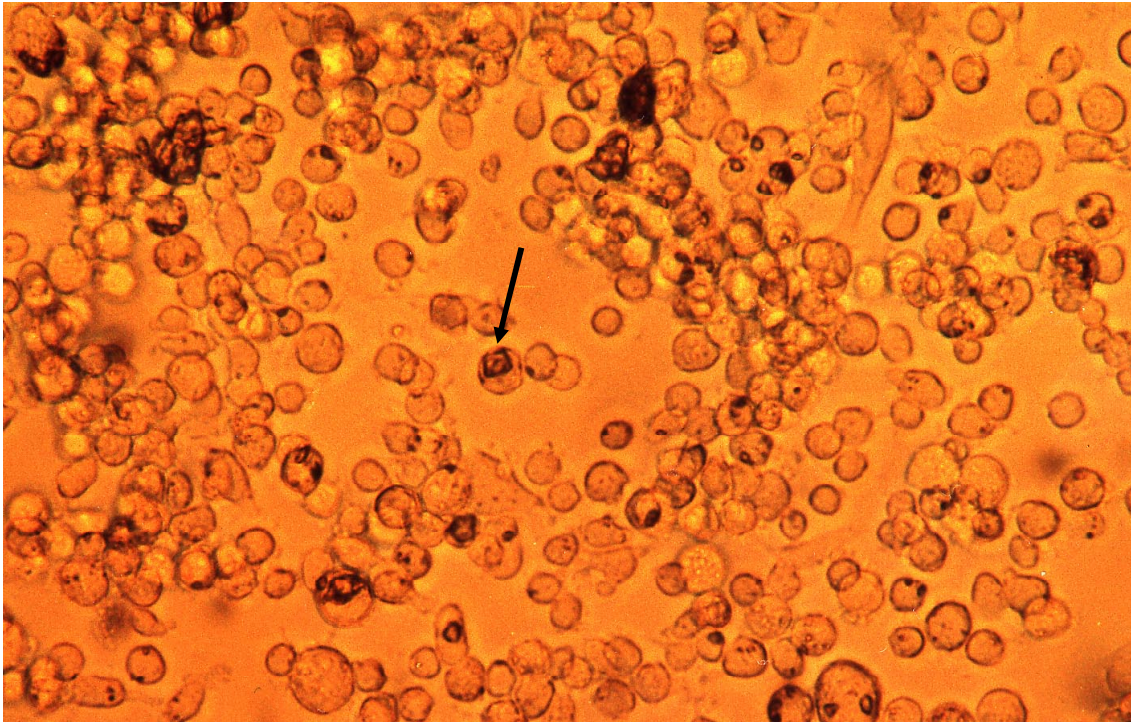


Abbildung 61: R2-Makrophagen nach 24 h Inkubation mit  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Titandioxid (Vergrößerung 100x)

Eine anderes Bild ergab sich für  $\alpha$ -Christobalit (Abb. 62). Dieses wurde ebenfalls vollständig phagozytiert ( $\leftarrow$ ), die Partikeldichte war jedoch für diese Partikel deutlich geringer als bei Titandioxid.

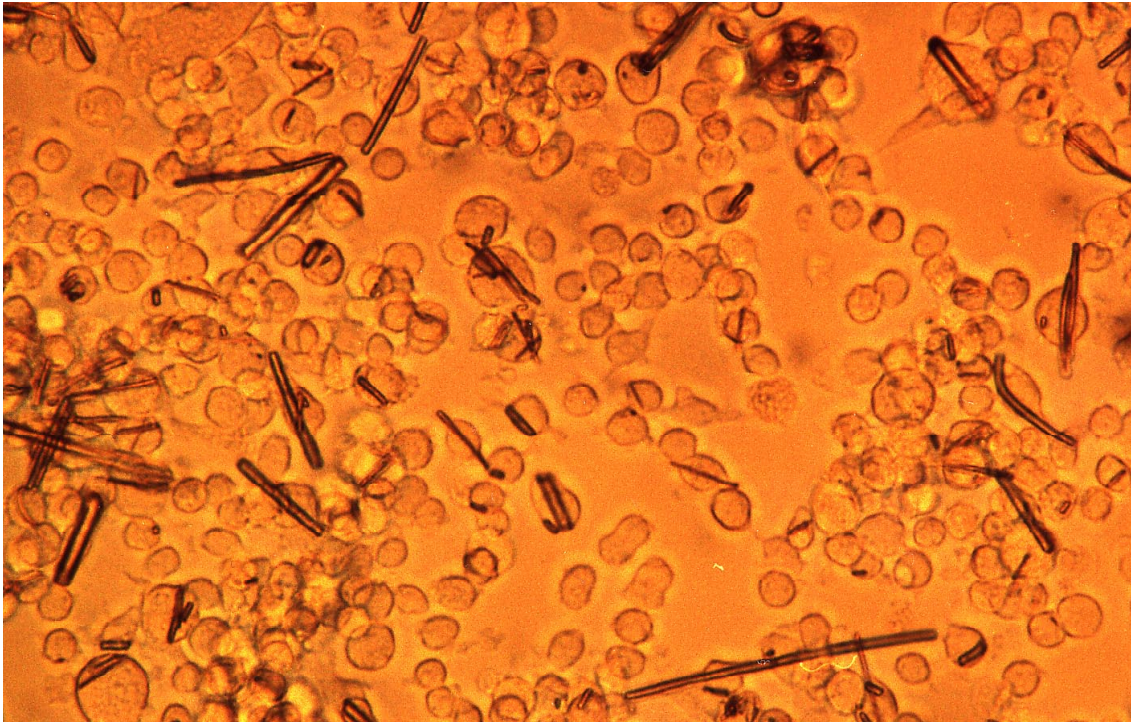




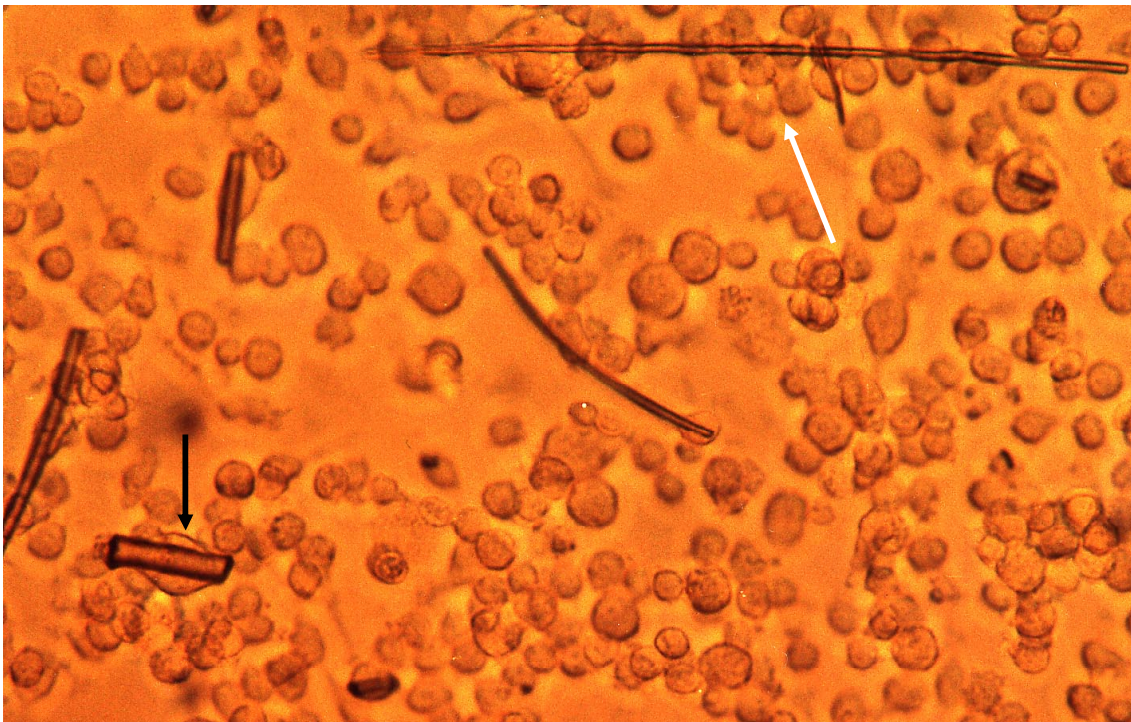
**Abbildung 62: R2-Makrophagen nach 24 h Inkubation mit 50 µg/cm<sup>2</sup> α-Christobalit (Vergrößerung 100x)**

Keramikfasern, Glaswolle und Steinwolle sind sich in ihrer Struktur sehr ähnlich (Abbildungen 63, 64, 65). Trotz der Größe dieser Fasern zeigte sich, daß Makrophagen auch Strukturen inkorporieren, die z.T. um ein Vielfaches größer sind als sie selbst (←). Fasern, die nicht komplett phagozytierbar waren, wurden von den Zellen (⇐) teilweise umgeben (Abbildung 72).



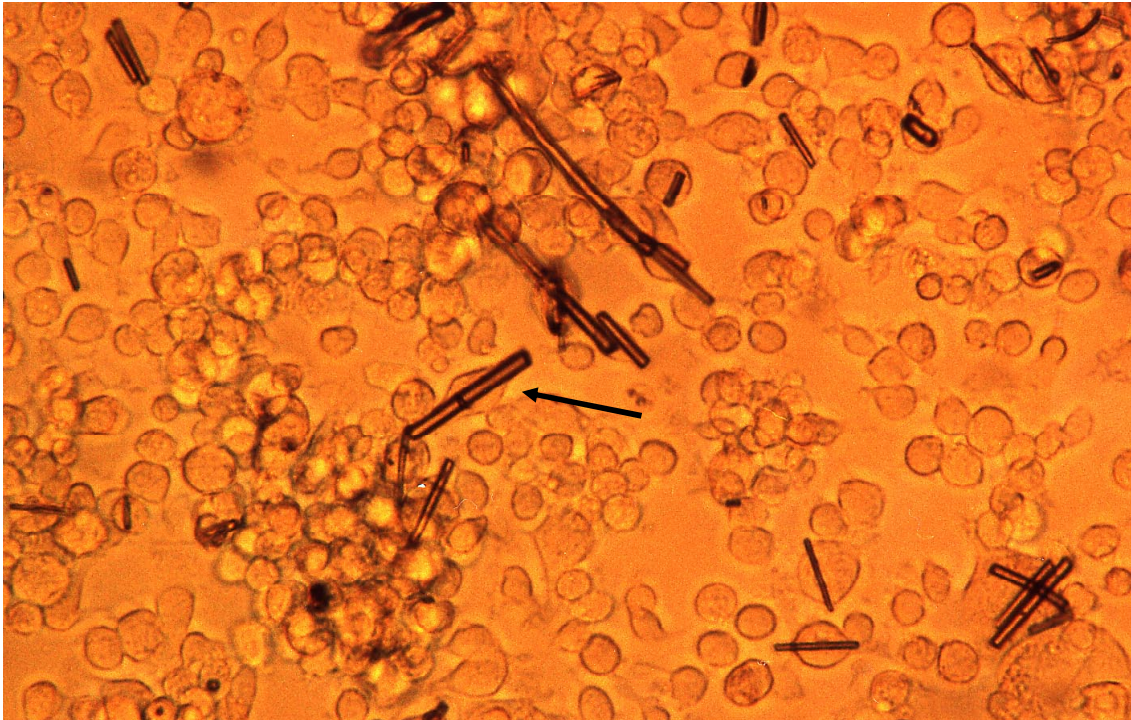


**Abbildung 63: R2-Makrophagen nach 24 h Inkubation mit 50 µg/cm<sup>2</sup> Keramikfasern (Vergrößerung 100x)**



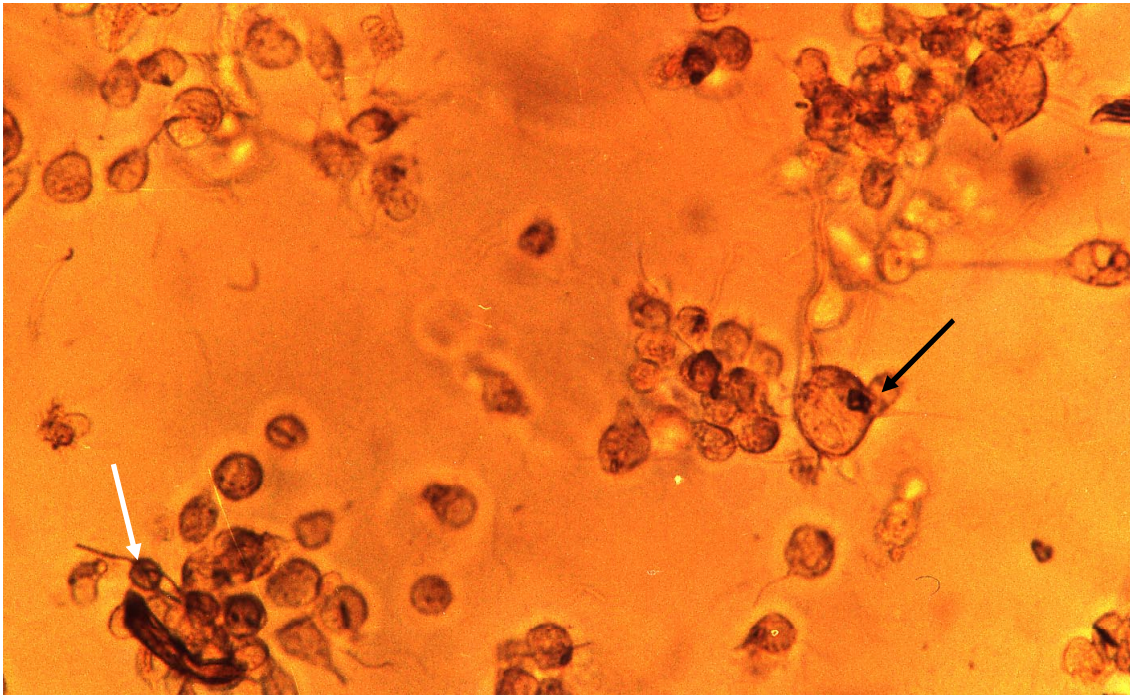
**Abbildung 64: R2-Makrophagen nach 24 h Inkubation mit 50 µg/cm<sup>2</sup> Glaswolle (Vergrößerung 100x)**





**Abbildung 65: R2-Makrophagen nach 24 h Inkubation mit 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Steinwolle (Vergrößerung 100x)**

Abbildung 66 zeigt die Interaktion der R2-Makrophagen mit Asbestfasern. Obwohl Asbest in seiner chemischen Zusammensetzung den bereits beschriebenen Fasern/Partikeln sehr ähnlich ist, so ist die Struktur doch sehr unterschiedlich. Es handelt sich bei Asbest um ein Fasergeflecht, an das sich die R2-Makrophagen anlagern ( $\Leftarrow$ ). Kleinere Bruchstücke wurden phagozytiert ( $\leftarrow$ ).



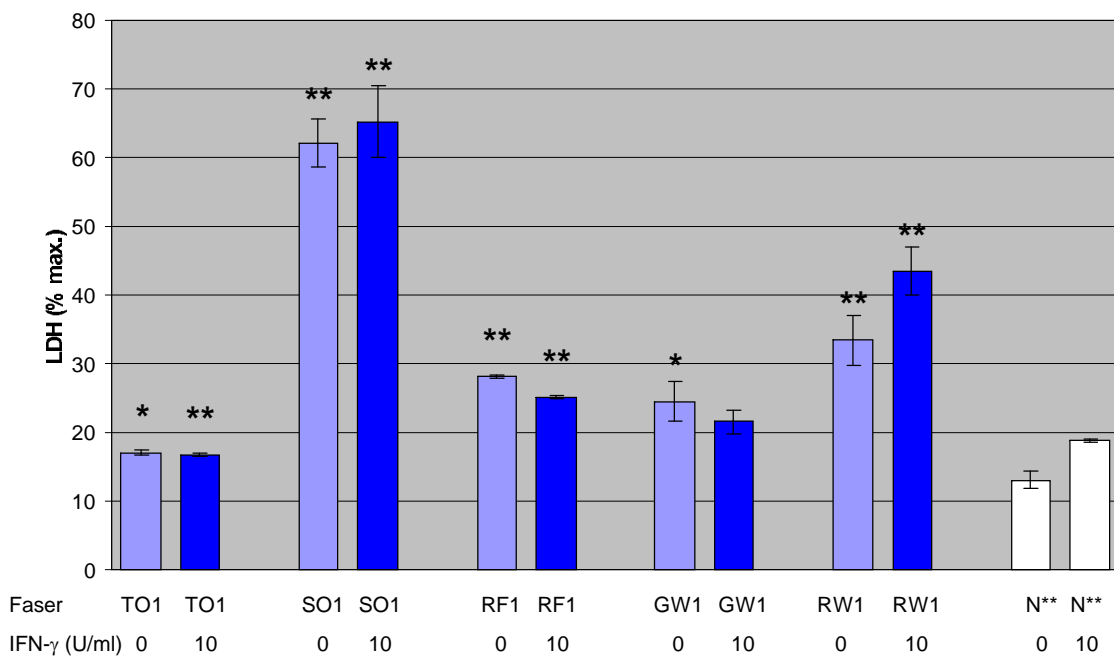
**Abbildung 66: R2-Makrophagen nach 24 h Inkubation mit 50 µg/cm<sup>2</sup> Asbestfasern (Vergrößerung 100x)**

Alle Bilder wurden unter Verwendung der gleichen Konzentration der Fasern/Partikel aufgenommen (50 µg/cm<sup>2</sup>). In der Mikroskopie wurde deutlich, daß auch die Anzahl der tatsächlich phagozytierbaren Fasern/Partikel für die Aktivierung der Zellen von Bedeutung sein könnte. Es sind z.B. sehr viel mehr Titandioxidpartikel als Glaswollfasern in einem Versuchsansatz in Kontakt mit Makrophagen. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurde im folgenden Ansatz nicht die Konzentration in Masse/Fläche gleichgesetzt, sondern die Anzahl der Partikel pro Fläche gleichgesetzt. Dafür wurde für alle Fasern/Partikel pro Kavität  $1,3 \times 10^6$  Fasern/Partikel pro cm<sup>2</sup> eingesetzt. Übertragen auf die Masse bedeutet dies für Titandioxid 16 µg/cm<sup>2</sup>, Christobalit 160 µg/cm<sup>2</sup>, Keramik 320 µg/cm<sup>2</sup>, Glaswolle 2900 µg/cm<sup>2</sup> und Steinwolle 710 µg/cm<sup>2</sup>. Somit sind die folgenden Versuche unabhängig von der Masse und Größe der Fasern und Partikel. Da für Asbest aufgrund der netzartigen Struktur keine Faserzahl bestimmt werden konnte (die Fasern ließen sich mikroskopisch nicht voneinander trennen), wurde dieses Material im folgenden Versuch nicht eingesetzt.

### 3.4.1. Stimulation von NR8383-Makrophagen mit gleicher Faser- und Partikelzahl

#### 3.4.1.1. Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von LDH durch NR8383-Makrophagen

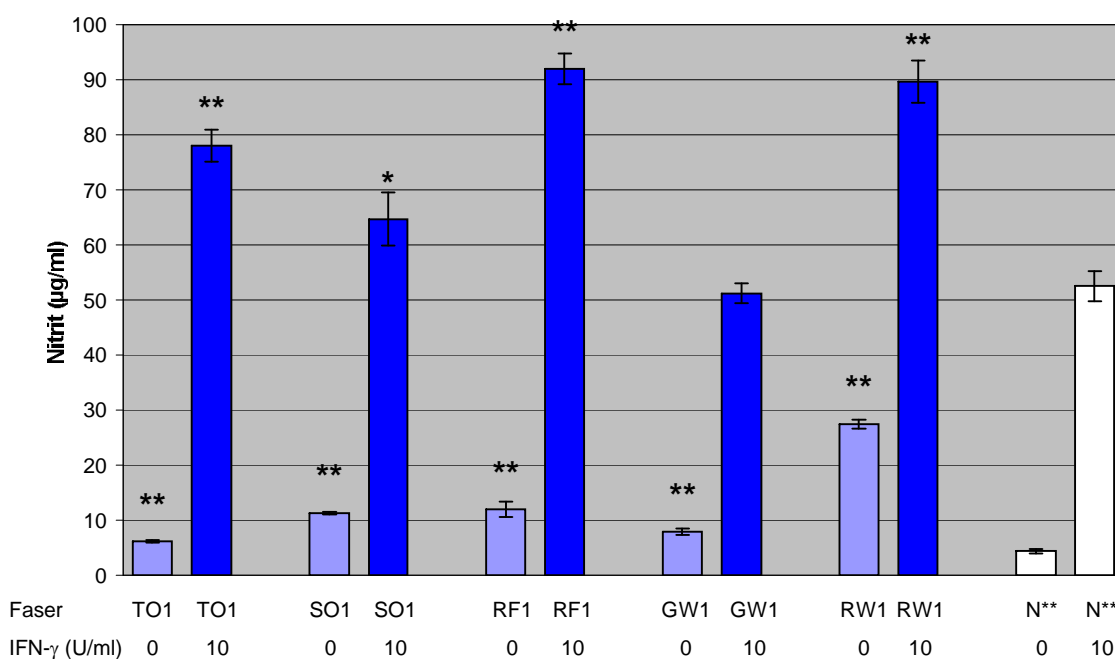
Um die folgenden Ergebnisse richtig interpretieren zu können wurde auch hier zunächst die Toxizität der eingesetzten Faser-/Partikelkonzentrationen anhand der Freisetzung von LDH nach 24h Inkubation ermittelt (Abbildung 67). Anhand der Vergleiche zu den Kontrollen wurden hier die Signifikanzen errechnet. In den eingesetzten Konzentrationen stellte sich heraus, daß Titandioxid keine relevante toxische Wirkung auf die NR8383-Makrophagen hatten. Im Gegensatz dazu verursachten Keramikfasern, Steinwolle und Christobalit nach 24-stündiger Inkubation mit den Zellen einen signifikanten Anstieg der LDH im Überstand (Christobalit > Keramik > Steinwolle). Glaswolle ist tendenziell zytotoxisch für NR8383-Makrophagen.



**Abbildung 67:** Einfluß verschiedener Fasern mit gleicher Faserzahl ( $1,3 \times 10^6$  pE/cm<sup>2</sup>) mit und ohne IFN-γ auf die Freisetzung von LDH durch NR8383-Makrophagen. Bestimmung nach 24 Stunden. TO1 = Titandioxid, SO1 = α-Christobalit, RF1 = Keramikfasern, GW1 = Glaswolle, RW1 = Steinwolle, N\*\* = PBS w Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>.

### 3.4.1.2. Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von NO-Radikalen durch NR8383-Makrophagen

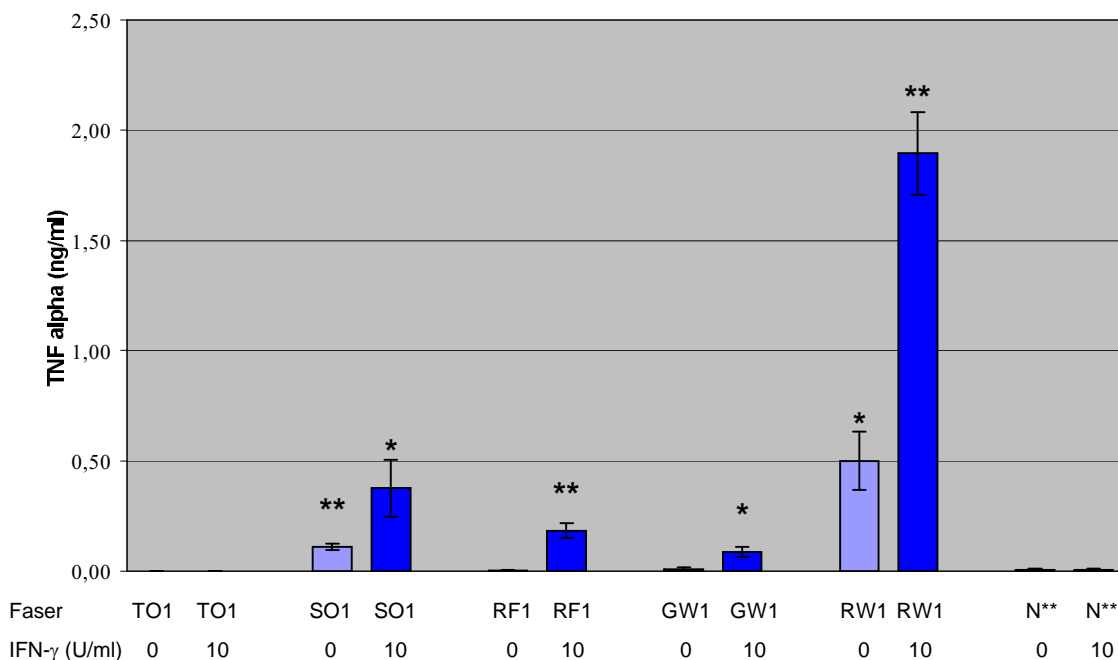
Titandioxid, Christobalit, Keramik und Glaswolle führten bereits bei alleiniger Applikation zu einem signifikanten Anstieg des Nitrits im Kulturüberstand im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle. Ein deutlicher Effekt wurde durch Steinwolle induziert. In der Kostimulation mit IFN- $\gamma$  waren diese Effekte außer für Glaswolle ebenfalls deutlich ausgeprägt. Anzumerken ist, daß die Zellen in diesem Ansatz allesamt sehr empfindlich auf die Gabe von IFN- $\gamma$  reagierten, entsprechende Kontrollen (nur IFN- $\gamma$ ) zeigten bereits eine deutliche Freisetzung von NO (Abbildung 68).



**Abbildung 68: Einfluß verschiedener Fasern mit gleicher Faserzahl ( $1,3 \times 10^6$  pE/cm<sup>2</sup>) mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von Nitrit durch NR8383-Makrophagen. Bestimmung nach 24 Stunden. TO1 = Titandioxid, SO1 =  $\alpha$ -Christobalit, RF1 = Keramikfasern, GW1 = Glaswolle, RW1 = Steinwolle, N\*\* = PBS w Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>.**

### 3.4.1.3 Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$ durch NR8383-Makrophagen

In diesem Ansatz konnte gezeigt werden, daß Christobalit und Steinwolle bereits allein eine Freisetzung von TNF- $\alpha$  hervorriefen. In der Kostimulation mit IFN- $\gamma$  kam es bei Christobalit, Keramik, Glaswolle und bei Steinwolle zu einem signifikanten Anstieg des TNF- $\alpha$ -Konzentration im Überstand, wobei der deutlichste Effekt auch hier durch Steinwolle hervorgerufen wurde (Abbildung 69).

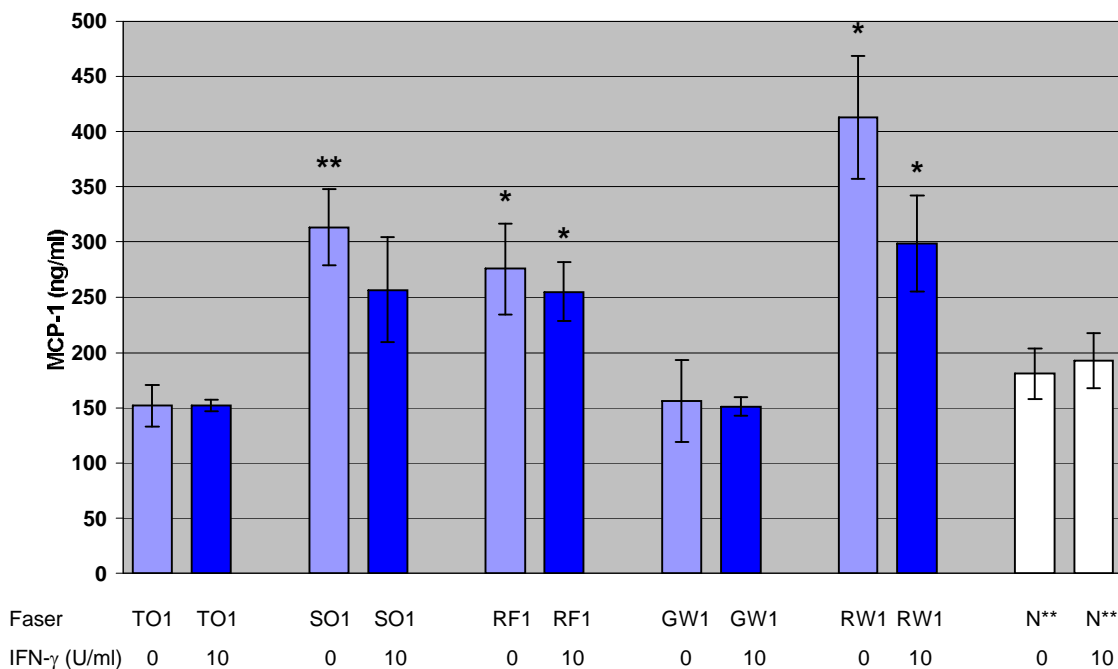


**Abbildung 69: Einfluß verschiedener Fasern mit gleicher Faserzahl ( $1,3 \times 10^6$  pE/cm<sup>2</sup>) mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$  durch NR8383-Makrophagen. Bestimmung nach 24 Stunden. TO1 = Titandioxid, SO1 =  $\alpha$ -Christobalit, RF1 = Keramikfasern, GW1 = Glaswolle, RW1 = Steinwolle, N\*\* = PBS w Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>.**



### 3.4.1.3. Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von MCP-1 durch NR8383-Makrophagen

In der Abbildung 70 ist die Menge an produziertem MCP-1 nach Stimulation der Zellen mit gleichen Konzentrationen an Fasern/Partikeln dargestellt. Christobalit, Keramik und Steinwolle führten alleine zu einem signifikanten Anstieg der MCP-1-Produktion. Bei Keramik und Steinwolle war auch nach Kostimulation mit IFN- $\gamma$  eine Steigerung der Freisetzung zu verzeichnen, bei Christobalit konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Titanoxid und Glaswolle hatten unter diesen Bedingungen keinen signifikanten Einfluß auf die Produktion dieses Chemokins.

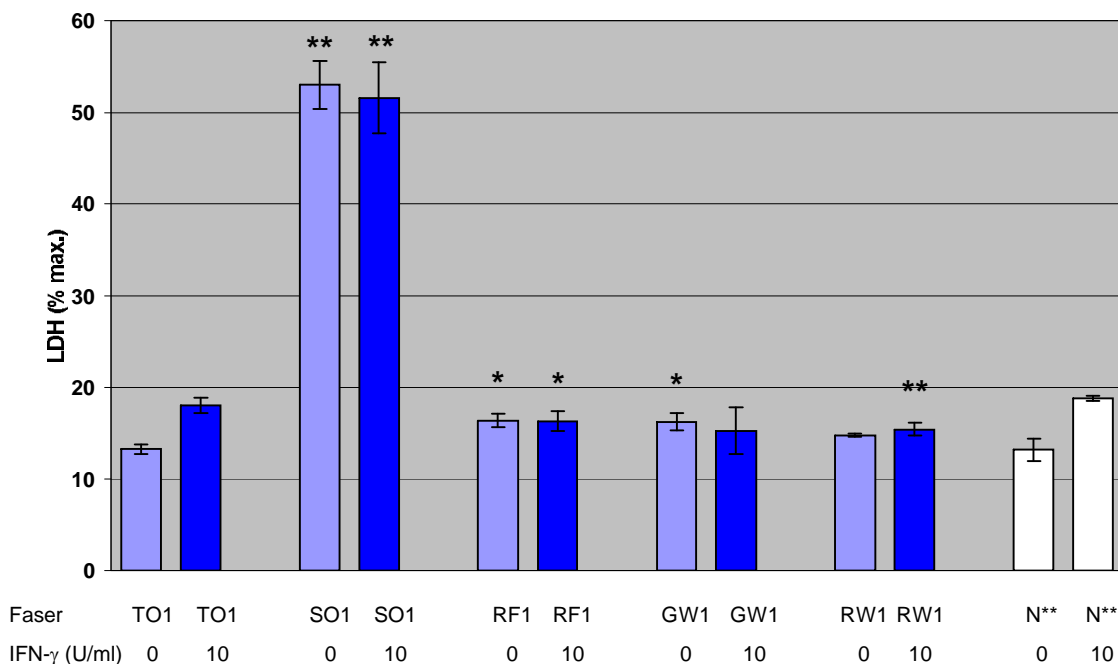


**Abbildung 70:** Einfluß verschiedener Fasern mit gleicher Faserzahl ( $1,3 \times 10^6$  pE/cm<sup>2</sup>) mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von MCP-1 durch NR8383-Makrophagen. Bestimmung nach 24 Stunden. TO1 = Titandioxid, SO1 =  $\alpha$ -Christobalit, RF1 = Keramikfasern, GW1 = Glaswolle, RW1 = Steinwolle, N\*\* = PBS w Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>.

### 3.4.2. Stimulation von R2-Makrophagen mit gleicher Faser- und Partikelzahl

#### 3.4.2.1. Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von LDH durch R2-Makrophagen

Nach 24 Stunden Inkubation von R2-Zellen mit den verschiedenen Fasern/Partikeln wurde die Konzentration der LDH im Kulturüberstand ermittelt, die Ergebnisse sind Abbildung 71 dargestellt. Der deutlichste Effekt auf die Freisetzung von LDH konnte für Christobalit beobachtet werden (alleine und in der Kostimulation mit IFN- $\gamma$ ). Die Stimulation der R2-Makrophagen mit Titandioxid, Steinwolke, Keramikfasern und Glaswolke führte weder alleine noch nach Kostimulation mit IFN- $\gamma$  zu einem relevanten Anstieg der LDH im Zellkulturüberstand.

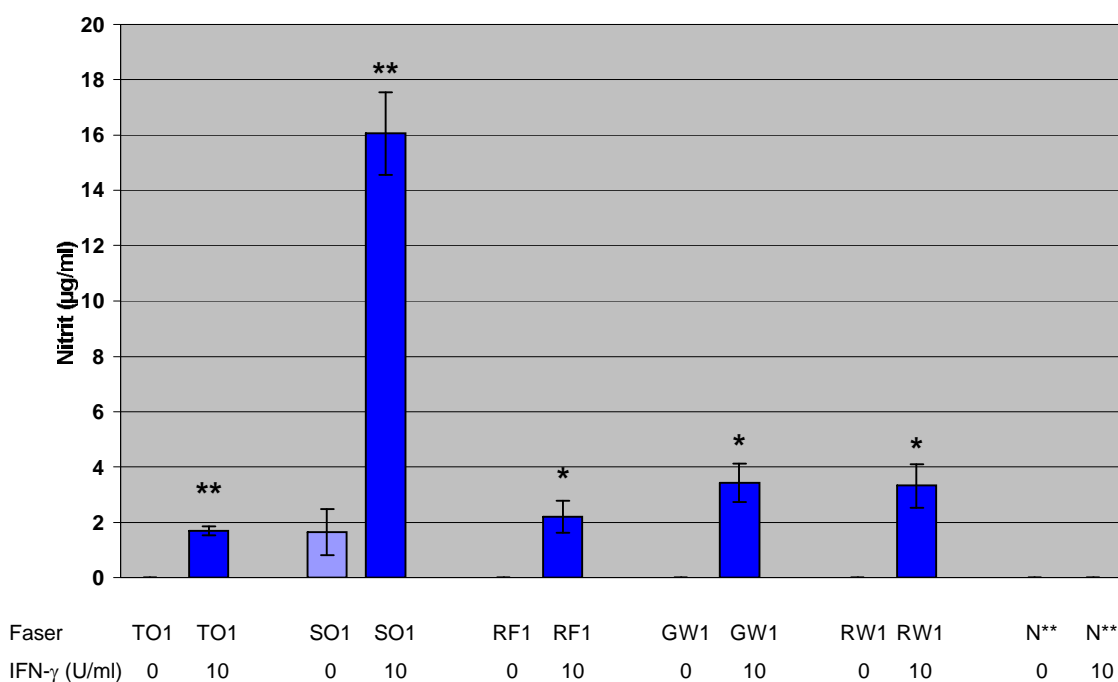


**Abbildung 71: Einfluß verschiedener Fasern mit gleicher Faserzahl ( $1,3 \times 10^6$  pE/cm<sup>2</sup>) mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von LDH durch R2-Makrophagen. Bestimmung nach 24 Stunden. TO1 = Titandioxid, SO1 =  $\alpha$ -Christobalit, RF1 = Keramikfasern, GW1 = Glaswolke, RW1 = Steinwolke, N\*\* = PBS w Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>.**



### 3.4.2.2. Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von NO-Radikalen durch R2-Makrophagen

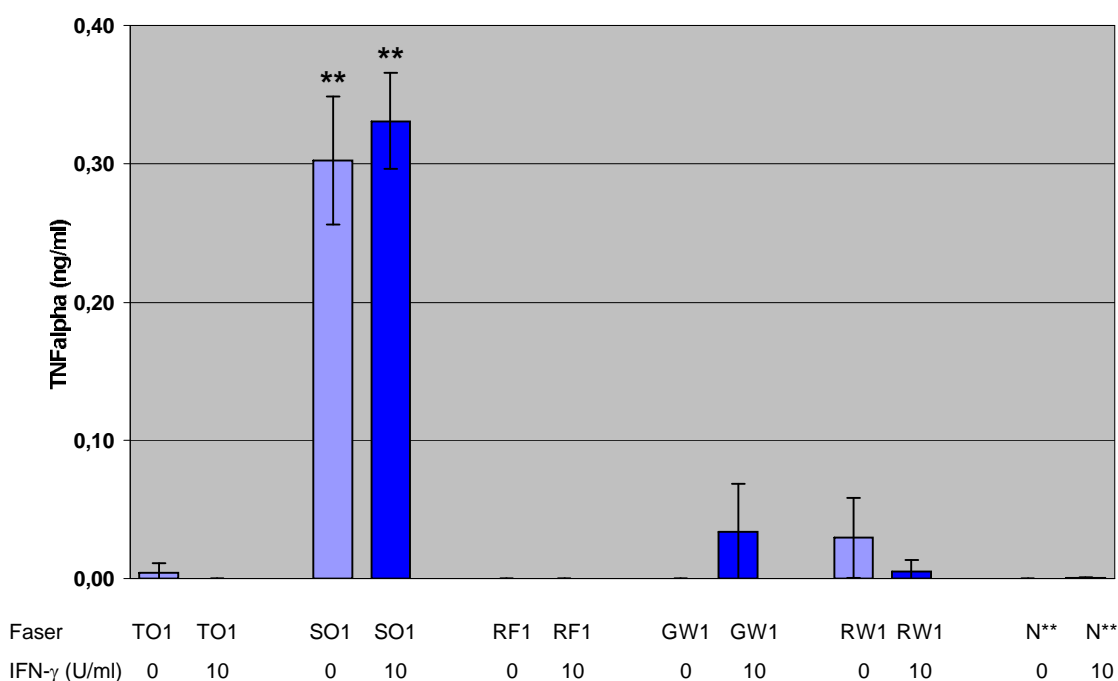
In diesem Versuch wurde der Einfluß verschiedener Fasern bei gleicher Faserzahl auf die Freisetzung von NO-Radikalen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 72 dargestellt. Besonders Christobalit führte zu einem drastischen Anstieg des Nitrits im Überstand. Vor allem in der Kombination mit IFN- $\gamma$  kam es zu einer ausgeprägten Zunahme der Nitritfreisetzung, die weitaus deutlicher ausfiel, als bei den anderen Substanzen. Titandioxid, Keramik, Glaswolle und auch Steinwolle führten nur in der Kombination mit dem endogenen Kostimulus IFN- $\gamma$  zu einer Nitrit-Produktion durch R2-Makrophagen.



**Abbildung 72: Einfluß verschiedener Fasern mit gleicher Faserzahl ( $1,3 \times 10^6$  pE/cm<sup>2</sup>) mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von Nitrit durch R2-Makrophagen. Bestimmung nach 24 Stunden. TO1 = Titandioxid, SO1 =  $\alpha$ -Christobalit, RF1 = Keramikfasern, GW1 = Glaswolle, RW1 = Steinwolle, N\*\* = PBS w Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>.**

### 3.4.2.3. Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$ durch R2-Makrophagen

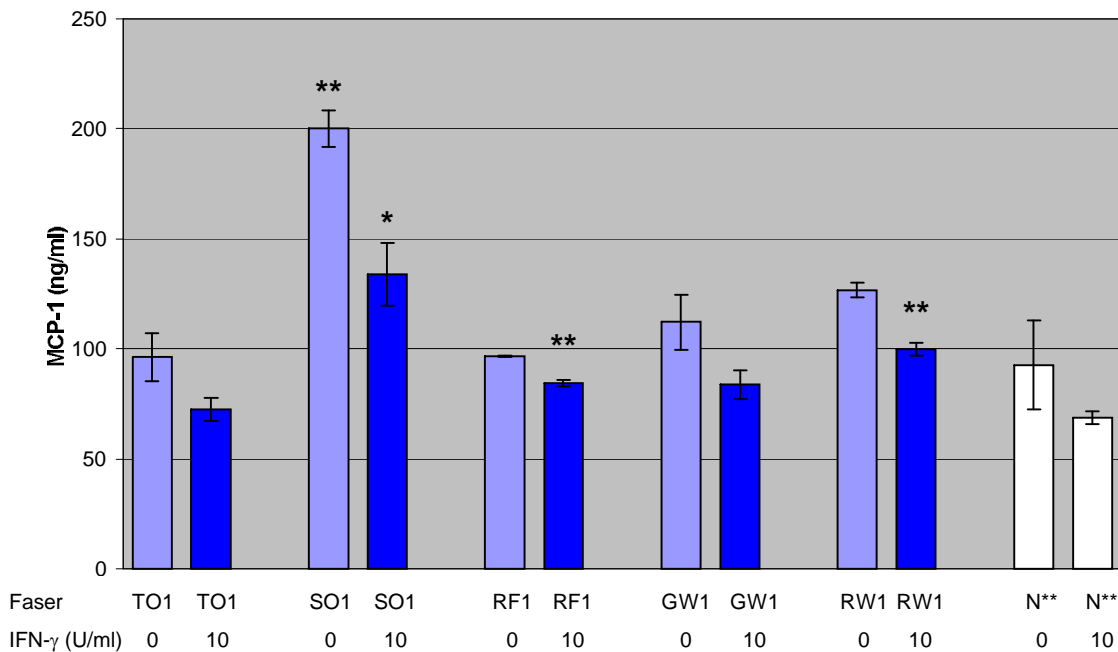
Die Stimulation der R2-Makrophagen mit Christobalit zeigte einen deutlichen Effekt auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$  durch die Zellen. Sowohl in der alleinigen Stimulation als auch in der Kombination mit IFN- $\gamma$  kam es zu einer Steigerung der Produktion von TNF- $\alpha$  (Abbildung 73). Weder Titandioxid, Keramik, Glaswolle noch Steinwolle hatten sowohl allein als auch in der Kostimulation mit IFN- $\gamma$  eine signifikante Wirkung auf die im Überstand meßbare TNF- $\alpha$ -Konzentration.



**Abbildung 73:** Einfluß verschiedener Fasern mit gleicher Faserzahl ( $1,3 \times 10^6$  pE/cm<sup>2</sup>) mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$  durch R2-Makrophagen. Bestimmung nach 24 Stunden. TO1 = Titandioxid, SO1 =  $\alpha$ -Christobalit, RF1 = Keramikfasern, GW1 = Glaswolle, RW1 = Steinwolle, N\*\* = PBS w Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>.

#### 3.4.2.4. Einfluß identischer Faser- und Partikelzahlen auf die Freisetzung von MCP-1 durch R2-Makrophagen

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß Christobalit in beiden Fällen (allein und kombiniert mit IFN- $\gamma$ ) zu einem Anstieg von MCP-1 führte, während sowohl Keramikfasern als auch Steinwolle R2-Makrophagen zu einer gesteigerten Produktion von MCP-1 nur in der Kostimulation mit IFN- $\gamma$  anregen konnten (Abbildung 74). Titandioxid und Glaswolle hatten keinen Einfluß auf die Freisetzung von MCP-1 durch die R2-Zellen.

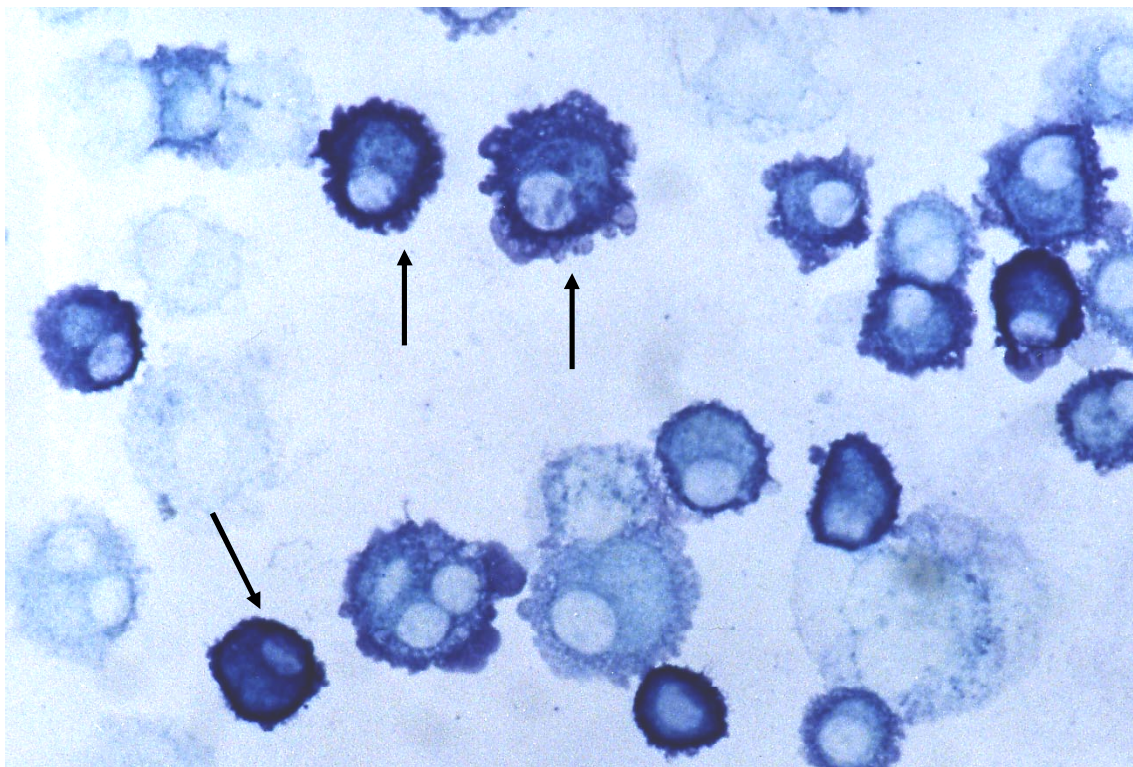


**Abbildung 74: Einfluß verschiedener Fasern mit gleicher Faserzahl ( $1,3 \times 10^6$  pE/cm<sup>2</sup>) mit und ohne IFN- $\gamma$  auf die Freisetzung von MCP-1 durch R2-Makrophagen. Bestimmung nach 24 Stunden. TO1 = Titandioxid, SO1 =  $\alpha$ -Christobalit, RF1 = Keramikfasern, GW1 = Glaswolle, RW1 = Steinwolle, N\*\* = PBS w Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>.**

### 3.5. Nachweis der Expression von iNOS mittels Immunhistochemie

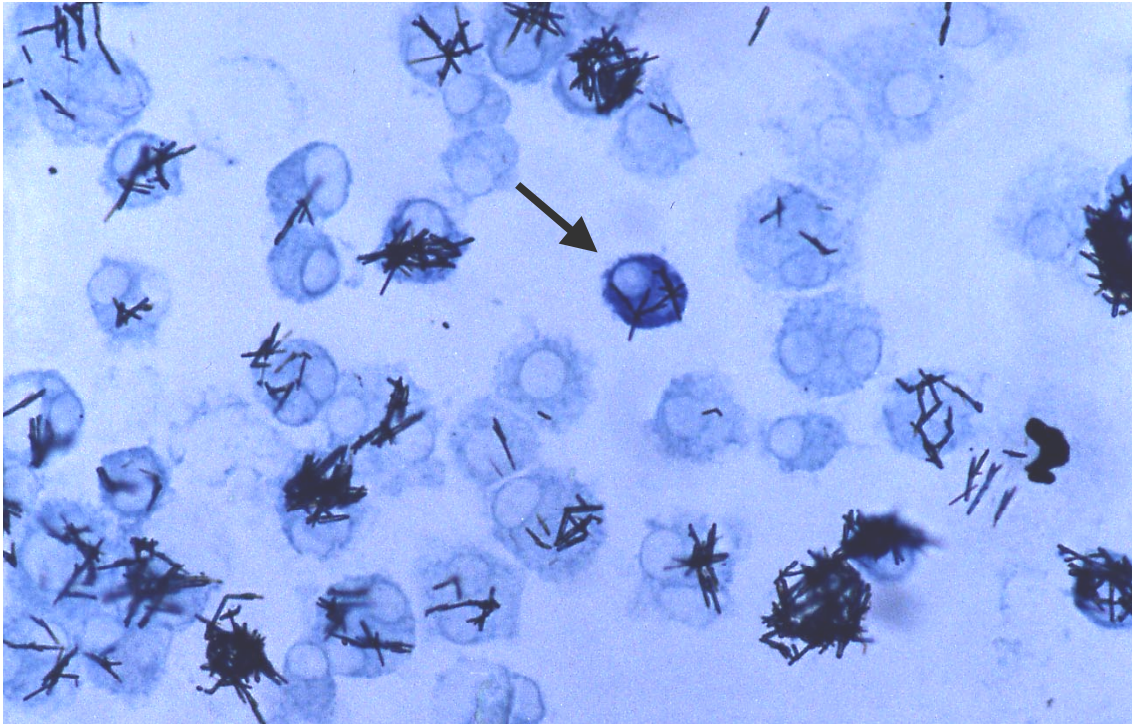
In den vorangegangenen Versuchen wurde die Freisetzung von NO-Radikalen im Kulturüberstand indirekt über das Endprodukt Nitrit mittels der Griess-Reaktion quantitativ nachgewiesen worden. Diese Resultate sollten durch immunhistochemischen Nachweis des Enzyms iNOS, das für die NO-Produktion in Makrophagen verantwortlich ist, gestützt werden.

Als Positivkontrolle wurden NR8383-Makrophagen mit 10 ng/ml LPS und 10 U/ml IFN- $\gamma$  stimuliert (Abbildung 75). Deutlich erkennt man einige Zellen, die iNOS in hohem Maße exprimieren, aber nicht alle Zellen zeigen eine Anfärbung. Außerdem gab es Unterschiede in der Färbungsintensität der Zellen. Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch, daß Fasern und Partikel vor allem nach Kostimulation mit IFN- $\gamma$  zur Induktion der iNOS-Expression führten.



**Abbildung 75:** Immunhistochemischer Nachweis von iNOS in NR8383-Makrophagen nach Stimulation mit LPS (10 ng/ml) und IFN- $\gamma$  (10 U/ml) für 24 h. ( $\leftarrow$ ) = iNOS-positive Zelle. (Vergrößerung 300x).

In Abbildung 76 sieht man NR8383-Makrophagen, die mit Titanoxid und IFN- $\gamma$  stimuliert wurden. Deutlich erkennt man im Zentrum eine iNOS-positive Zelle ( $\leftarrow$ ), während andere, ebenfalls reichlich mit Fasern beladene Zellen, keine iNOS-Expression aufweisen.



**Abbildung 76: Immunhistochemischer Nachweis von iNOS in NR8383-Makrophagen nach Stimulation mit Titandioxid (10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und IFN- $\gamma$  (10 U/ml) für 24 h. ( $\leftarrow$ ) = iNOS-positive Zelle mit phagozytierten Partikeln. (Vergrößerung 300x)**

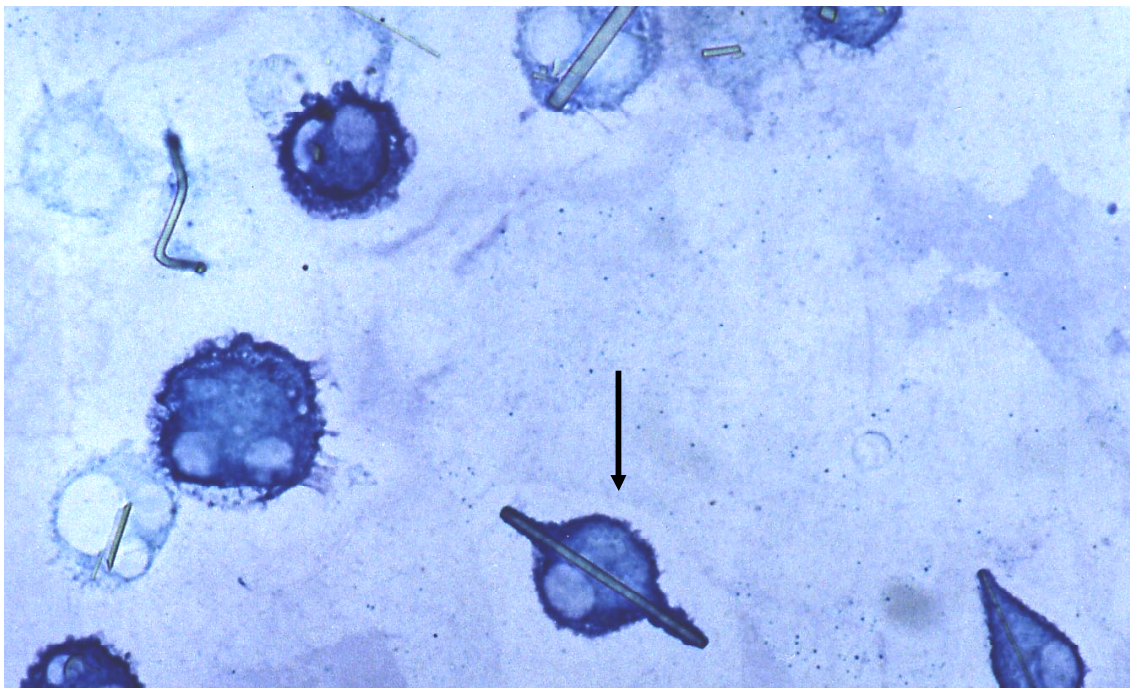
Ein ähnliches Bild ergab sich nach der Stimulation der NR8383-Makrophagen mit Keramikfasern und IFN- $\gamma$ . Ein Großteil der Zellen, die Fasern phagozytiert haben, sind iNOS negativ. Einzelne Zellen waren aber deutlich positiv für dieses Enzym. Im Zellinneren der hervorgehobenen Zellen sind deutlich drei parallel angeordnete Fasern erkennbar (Abbildung 77).

Bei den Makrophagen, die mit IFN- $\gamma$  und Steinwolle stimuliert wurden, zeigte sich wiederum, daß nicht alle Zellen, die Fasern phagozytiert haben, auch iNOS exprimierten (Abbildung 78). Bei allen immunhistochemischen Färbungen zeigte sich, daß vereinzelt auch Makrophagen, in denen keine phagozytierten Partikel nachgewiesen werden konnten, iNOS exprimierten.





**Abbildung 77:** Immunhistochemischer Nachweis von iNOS in NR8383-Makrophagen nach Stimulation mit Keramikfasern ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und  $\text{IFN-}\gamma$  ( $10 \text{ U}/\text{ml}$ ) für 24 h. ( $\leftarrow$ ) = iNOS-positive Zelle mit phagozytierten Fasern. ( $\rightleftharpoons$ ) = iNOS-negative Zelle. (Vergrößerung 300x)



**Abbildung 78:** Immunhistochemischer Nachweis von iNOS in NR8383-Makrophagen nach Stimulation mit Steinwolle ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und  $\text{IFN-}\gamma$  ( $10 \text{ U}/\text{ml}$ ) für 24 h. ( $\leftarrow$ ) = iNOS-positive Zellen mit phagozytierten Steinwolle-Fasern. (Vergrößerung 300x)

## **4. Diskussion**

### **4.1. Gesundheitliche Gefährdung des Menschen durch MMVF**

Übereinstimmend ergaben mehrere Studien, daß bei mindestens 4 bis 10 Prozent der internistisch behandelten Patienten arbeitsbedingte Einwirkungen den wesentlichen pathogenetischen Faktor darstellen. Von ähnlichen Anteilen ist auch bei Patienten aus anderen klinischen Fächern auszugehen. Neben Hautkrankheiten und der Lärmschwerhörigkeit stehen Lungen- und Pleuraerkrankungen (ca. 10 000 Anzeigen) und Atemwegserkrankungen (mehr als 7 000 Anzeigen) laut dem Unfallverhütungsbericht 2000 des Bundesministeriums für Arbeit und Sozialordnung an dritter und vierter Position. Einer detaillierten Aufschlüsselung der unfallversicherungsseitig bestätigten Fälle von Atemwegserkrankungen aus dem Jahre 2001 zufolge finden sich hierunter 544 Fälle einer chron. obstruktiven Bronchitis und/oder Emphysem von Steinkohlebergleuten (Berufskrankheit BK 4111). Asbeststaublungerkrankungen oder durch Asbeststaub verursachte Erkrankungen der Pleura (BK 4103) waren bei verschiedenen Berufen 1922 mal und Silikosen (BK 4101) 1517 v.a. bei Bergleuten die Ursache für eine Berufserkrankung. (Baur et al. 2003). Die Zahlen belegen, daß die Pneumokoniosen auch heute noch eine bedeutende Rolle in der Arbeitsmedizin spielen. In der Industrie werden mittlerweile neue mineralische Fasern (Mineral Made Vitreous Fibres, MMVF) eingesetzt. Diese weisen jedoch chemische und physikalische Ähnlichkeiten zu Substanzen wie z.B. Asbest auf, für die ein krankheitsverursachendes Potential bekannt und hinreichend untersucht ist. Man vermutet, daß diese alternativen Materialien ebenfalls Krankheiten des Menschen verursachen können. Um dieser Frage nachzugehen muß zunächst geklärt werden, ob es Hinweise darauf gibt, die einen solchen Verdacht nahe legen. Für die Beurteilung der biologischen Gefährdung finden sich prinzipiell zwei unterschiedlichen Ansätze. 1) Kann es überhaupt zu einem Kontakt zwischen Menschen und Fasern bzw. Partikeln kommen, also die Frage nach der Staubbelastung des Menschen. 2) Zum anderen muß untersucht werden, ob Erkrankungen v.a. des respiratorischen Systems inkl. Neoplasien der Lunge gehäuft in den exponierten Populationen auftreten.

Um die Gefährdung des Menschen durch MMVF einschätzen zu können, ist es nötig, die möglichen Expositionsquellen aufzuzeigen und in ihrer Bedeutung als Gefahrenquelle einzuschätzen. Zum einen bilden der industrielle Arbeitsplatz und zum anderen der Wohnraum potentiellen Quellen, die zu einer Belastung des Menschen durch MMVF Stäube führen können. Bezüglich der häuslichen Belastung ergab eine Multicenter Studie in den USA entwarnende Ergebnisse. Durch die Verwendung von MMVF als Dämmmaterialien in privaten Haushalten sowie in öffentlichen Gebäuden konnte eine erhöhte Staubbelastung nicht nachgewiesen werden (Carter et al. 1999). Von einer Gefährdung des Menschen kann folglich hier nicht ausgegangen werden.

Im Gegensatz hierzu kann es am Arbeitsplatz zu einer gesteigerten Exposition des Menschen durch MMVF kommen. Durch den täglichen Umgang mit diversen Stäuben ist es durchaus denkbar, daß auch Krankheiten, insbesondere die des Respirationstrakts, verursacht werden. In der Industrie gibt es deshalb die so genannten MAK (maximale Arbeitsplatzkonzentration) und BAT-Werte (biologische Arbeitsstofftoleranzwerte) als Richtlinien. MAK ist die höchstzulässige Konzentration an gesundheitsschädlichen Arbeitstoffen als Gas, Dampf oder Schwebstoff in der Luft. BAT ist die höchstzulässige Menge eines Arbeitsstoffes bzw. seiner Stoffwechselprodukte in Körpermedien wie Blut, Harn, Alveolarluft. Auf die Problematik der Festlegung von BAT und MAK Grenzwerten soll hier nicht weiter eingegangen werden. Angemerkt werden soll jedoch, daß erst kürzlich (1997) der MAK Wert für Titandioxid im Rahmen der Absenkung des allgemeinen Staubgrenzwerts für alveolengängigen Staub von  $6 \text{ mg/m}^3$  auf  $1,5 \text{ mg/m}^3$  gesenkt wurde.

Um die Belastung des Menschen möglichst gering zu halten, müssen die Richtlinien eingehalten und kontrolliert werden. Insbesondere in Ländern mit minderen Hygienestandards gibt es hier die Notwendigkeit von Verbesserungen. Des weiteren gilt es, versteckte Expositionsquellen ausfindig zu machen und zu eliminieren.

Aus oben Gesagtem kann man schließen, daß es zu einer Exposition des Menschen durch MMVF am Arbeitsplatz kommen kann. Es stellt sich nun die Frage, ob diese Exposition mit einem gehäuften Auftreten von Erkrankungen einhergeht. Einige Arbeiten befassen sich mit diesem Thema. So konnten Sali et al. (1999) in einer Longitudinalstudie für Arbeiter, die länger als ein Jahr in



der Steinwoll-, Schlackenwoll- und Glaswollindustrie arbeiteten zeigen, daß das Morbiditätsrisiko für nichtneoplastische respiratorische Erkrankungen nicht erhöht war. Allerdings beschrieben die Autoren ein leicht erhöhtes Risiko für renale Erkrankungen und kardiale Ischämien. Boillat (1999) schreibt ebenfalls, daß es keinen Hinweis auf eine Assoziation zwischen der Exposition mit diversen Materialien und dem Auftreten von Fibrose, Pleuraläsionen und unspezifischen respiratorischen Erkrankungen gäbe. Eine mögliche Ausnahme bilde allerdings der Kontakt mit Keramikfasern. Hier bestünde jedoch noch weiterer Forschungsbedarf. In Kohortenstudien zeigte sich bei Arbeitern aus der Faserindustrie eine leicht erhöhte standardisierte Mortalitätsrate für Lungenkrebs, v.a. in der Zeit der frühen technologischen Phase. Es gab jedoch keinen Hinweis für das vermehrte Auftreten von Mesotheliomen. Eine Interpretation der Daten ist jedoch erschwert, da man keine Erkenntnisse über das entsprechende Rauchverhalten der Arbeiter gewonnen hatte.

In der Literatur finden sich jedoch auch Hinweise auf ein krankheitsverursachendes Potential der MMVF. So konnte in Tracheen der Ratte, nachdem diese mit Titandioxid inkubiert wurden, eine Induktion von Substanzen nachgewiesen werden, die zu einer Fibrose der Luftwege führen. Churg und Wright (2002) folgerten hieraus, daß mineralische Stäube eine Fibrose der Lunge auslösen können.

Bei hochgradiger Feinstaubexposition im Steinkohlebergbau unter Tage (z.B. bei Einwirkung einer kumulativen Feinstaubdosis von 100 Feinstaubjahren ( $[\text{mg}/\text{m}^3] \times \text{Jahre}$ )) ist bei Neuerkrankungen ab dem 1. Januar 1997 (Rückwirkungsklausel) eine Verursachung einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung bzw. eines Lungenemphysems (BK 4111) auch ohne Vorhandensein von silikosetypischen radiologischen Veränderungen anerkannt. In anderen Berufzweigen (z. B. Schweißer) werden ähnliche Erkrankungsformen infolge von langjähriger Rauch- bzw. Staubexposition diskutiert, wobei hier die arbeitshygienischen Verhältnisse (insbesondere die Kontamination der Arbeitsmaterialien) von besonderer Bedeutung zu sein scheinen (Baur et al. 2003).

Wie dargestellt, sind die Ergebnisse in der Literatur uneinheitlich. Von besonderem Interesse sind jedoch die Daten, die auf ein mögliches krankheitsverursachendes Potential der MMVF hinweisen. Es muß folglich

davon ausgegangen werden, daß alle MMVF prinzipiell in der Lage sind, akute und auch chronische (Entzündungs-)Reaktionen in der Lunge auszulösen.

Da es zunehmend zum Einsatz alternativer MMVF kommt, ist es notwendig, diese Substanzen in ihren Eigenschaften zu untersuchen. Ziel einer toxikologischen Bewertung dieser neuen Substanzen muß es sein, mit einfachen, kostengünstigen Methoden, ein Agens als biologisch harmlos oder gefährlich einstufen zu können. In vivo Untersuchungen sind für die Einschätzung des Gefährdungspotentials zu aufwendig, daher erfolgte die Suche nach einem geeigneten in vitro Testsystem.

In der Pathogenese der Pneumokoniosen spielen Makrophagen eine zentrale Rolle. Der Ansatz unseres Testsystems war daher, Fasern und Partikel dieser neuen Substanzen mit Makrophagenzelllinien in vitro in Kontakt zu bringen. Da es ein etabliertes Tiermodell zur Silikose bei der Ratte gibt und da die meisten Modelle zur Untersuchung toxischer Wirkungen von Fasern in vivo Rattenmodelle sind, wurden Zelllinien von diesem Tier eingesetzt. Zwei Makrophagenzelllinien - Alveolarmakrophagen und Pleuramakrophagen - sollten hier der Beurteilung alternativer Materialien in einem in vitro Test dienen.

Zunächst wurden die Makrophagenzelllinien R2 und NR8383 auf ihre makrophagentypischen Eigenschaften hin überprüft. Das Vorhandensein dieser Eigenschaften war die Grundvoraussetzung für die weiteren Untersuchungen, da Voraussagen für die Wirkung der Fasern in vivo nur mit Zellen erzielt werden können, die typische Eigenschaften ihrer Ursprungszellen aufweisen. Dafür wurden die Zelllinien mit den bekannten Substanzen LPS und IFN- $\gamma$  stimuliert und im Anschluß die Konzentration typischer Makrophagenprodukte im Überstand des Zellkulturmediums gemessen. Exemplarisch wurden die Monokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und MCP-1 untersucht. Als Beispiel für eine starke antimikrobiell wirksame Substanz wurde die Freisetzung von Stickstoffmonoxidradikalen untersucht. Da IFN- $\gamma$  eine Schlüsselrolle bei der Stimulation der Makrophagen besitzt, wurden die Versuche jeweils mit und ohne IFN- $\gamma$  durchgeführt. IFN- $\gamma$  stellt ein sogenanntes Trigger-Signal für Makrophagen dar. In vivo sind Th1-Zellen für die Synthese dieses Stimulus verantwortlich. Durch IFN- $\gamma$  kommt es zum sogenannten Priming der

Makrophagen, die damit empfänglich für einen zweiten Stimulus, wie z.B. LPS oder TNF- $\alpha$ , werden (Gemsa et al., 1997).

In den Untersuchungen konnte anhand der gemessenen LDH-Freisetzung (Abbildung 1, 6) gezeigt werden, daß die eingesetzten Substanzen LPS und IFN- $\gamma$  in Konzentrationen eingesetzt wurden, die auf die Zelllinien NR8383 und R2 keinen signifikanten toxischen Einfluß hatten. Dies war entscheidend für die Interpretation der nachfolgenden Ergebnisse, da immunmodulatorische und nicht toxische Effekte bei der Stimulation der Makrophagen gemessen werden sollten. Im Falle toxischer Wirkungen würden gespeicherte Mediatoren durch Zytolyse freigesetzt werden. Damit wären die gemessenen Konzentrationen an Zytokinen nicht als spezifische Reaktion zu werten.

Sowohl für die Freisetzung von TNF- $\alpha$  (Abbildung 3, 8) als auch für die Bildung von NO (Abbildung 2, 7) durch die beiden Zelllinien konnte ein dosisabhängiges Verhalten bei der Stimulation durch IFN- $\gamma$  und LPS nachgewiesen werden. Die Zellen verhielten sich wie in der Literatur für Makrophagen bereits ausführlich beschrieben. Liu et al. (1997) zeigten, daß iNOS in Rattenlungen durch LPS und IFN- $\gamma$  induziert werden kann. Der potenzierende Einfluß von IFN- $\gamma$  auf die LPS-induzierte iNOS Synthese von Makrophagen wurde ebenfalls von Griscavage et al. (1993) und Jesch et al. (1996) beschrieben.

Bei NR8383-Makrophagen konnte im Gegensatz zu den R2-Makrophagen eine spontane Basisproduktion von NO-Radikalen nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß die Zellen entweder voraktiviert waren oder durch die Transformation zur Zelllinie verändert worden sind. Möglicherweise spielt hier die unterschiedliche Herkunft der Makrophagen (Pleura, Alveolen) eine entscheidende Rolle. Ein prinzipiell unterschiedliches Reaktionsmuster der Zellen wäre hier durchaus denkbar.

In der Literatur werden Alveolarmakrophagen als die Hauptquelle für die Bildung von MCP-1 beschrieben (Flory et al., 1993; Brieland et al., 1993). Für beide Makrophagenzelllinien konnte gezeigt werden, daß sie MCP-1 synthetisieren (Abbildung 4, 9). Entscheidend ist jedoch, daß die Sekretion von MCP-1 trotz hoher Spontansekretion eine Modulation durch IFN- $\gamma$  und LPS erfährt. Die hohe Spontansekretion von MCP-1 fällt bei beiden Zelllinien auf. Prinzipiell konnte für beide Zelllinien eine Steigerung der Synthese nach Stimulation mit Endotoxin gezeigt werden, welche durch IFN- $\gamma$  gehemmt

wurde. Diese Modulation durch LPS und IFN- $\gamma$  entspricht der in vivo Situation, wie die Arbeiten von Gourmala et al. (1997) bestätigen. Die Autoren beschreiben ebenfalls in Übereinstimmung mit unseren Daten einen inhibitorischen Effekt von IFN- $\gamma$  auf die LPS-induzierte MCP-1 mRNA Synthese. Bei der Bestimmung der Konzentration von IL-1 $\beta$  im Kulturüberstand fiel auf, daß die gemessenen Werte sich an der Sensitivitätsgrenze des ELISA-Tests befanden (Abbildung 5,10). Somit sind diese Ergebnisse der Freisetzung von IL-1 $\beta$  nur mit Vorsicht zu interpretieren. In Übereinstimmung mit den Daten aus molekularbiologischen Analysen (A. Lewen, Diplomarbeit, 1999), konnte jedoch nachgewiesen werden, daß LPS die Produktion von IL-1 $\beta$  induziert. Diese Resultate stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Denholm et al. (1993), die ebenfalls eine Induktion von IL-1 $\beta$  durch LPS beschrieben. In Kombination mit IFN- $\gamma$  wird die IL-1 $\beta$ -Sekretion gehemmt. Foss et al. (1999) beobachteten ebenfalls das Fehlen eines kostimulierenden Effekts auf die Synthese von IL-1 $\beta$  durch IFN- $\gamma$ .

Auffällig ist die Suppression der IL-1 $\beta$  Produktion durch IFN- $\gamma$ . Obermeier et al. (1999) konnten bereits einen hemmenden Effekt von NO auf die Synthese von IL-1 $\beta$ -mRNA und IL-1 $\beta$  in der Zelllinie RAW 264.7 sowie in Zellen aus Peritonealexsudat feststellen. Bestätigt werden diese Ergebnisse durch Kim et al. (1998). In ihren Arbeiten zeigten sie, daß NO einen hemmenden Einfluß auf die Aktivität von IL-1 $\beta$ -converting enzyme aufwies. Über diesen Mechanismus wurde die Freisetzung von IL-1 $\beta$  gehemmt. Da die von uns verwendeten Zellen mit einer ausgeprägten Synthese von NO auf die Stimulation von LPS und IFN- $\gamma$  reagierten, ist die NO-induzierte Hemmung des IL-1 $\beta$ -converting enzymes eine mögliche Erklärung für die geringe Menge an freigesetztem IL-1 $\beta$ .

Durch die eingesetzten Stimuli LPS und IFN- $\gamma$  konnte gezeigt werden, daß sich die Zelllinien NR8383 und R2 in Bezug auf die untersuchten Mediatoren ähnlich zu primären Makrophagen verhalten. Beide Zelllinien reagierten prinzipiell gleich auf die verwendeten Stimuli. Somit sind die beiden Zelllinien geeignet, um Interaktionen zwischen Partikeln, Fasern und Makrophagen zu untersuchen.

Es gibt einige Determinanten, die eine wichtige Voraussetzung für die

Entstehung einer Pneumokoniose darstellen. In einem Review Artikel aus dem Jahre 2003 postulierten Muhle et al., daß bezüglich der *chronischen* Toxizität von Fasern und Partikeln, folgende Parameter von besonderem Interesse seien: die Dauer der Retention der Materialien innerhalb der Lunge, die persistierende intrapulmonale Entzündung mit entsprechender Epithelproliferation, progressiver Fibrose und der Genotoxizität. Diese Endpunkte sollten anzeigen, ob bestimmte Materialien für Menschen eine besondere gesundheitliche Gefährdung darstellten.

Im Mittelpunkt der persistierenden pulmonalen Entzündung mit einhergehender progressiver Fibrose steht zweifelsohne TNF- $\alpha$ . Wie Piguet (1990) nachweisen konnte, ist die Freisetzung von TNF- $\alpha$  eine Grundvoraussetzung für die Ausbildung einer Fibrose im Krankheitsgeschehen der Silikose. Somit kann die fehlende Fähigkeit, Makrophagen nach Stimulation mit Fasern/Partikeln zu einer Produktion von TNF- $\alpha$  anzuregen, ein Indikator für die fehlende Pathogenität der alternativen Materialien sein. Betrachtet man die Reaktionen der NR8383- und R2-Makrophagen, so lässt sich zusammenfassend für Asbestfasern und  $\alpha$ -Christobalit ein dosisabhängiger Effekt auf die Bildung von TNF- $\alpha$  nachweisen (Abbildung 25, 26, 47, 48). Die Kostimulation mit IFN- $\gamma$  konnte diesen Effekt noch steigern. Bestätigt werden die Ergebnisse in der Literatur. Es konnte gezeigt werden, daß humane Alveolarmakrophagen, die mit Chrysotil inkubiert wurden, u.a. eine gesteigerte Expression von TNF- $\alpha$  aufwiesen (Drumm et al. 1999). In vivo Daten von Pleuramakrophagen der Ratte nach Asbestfaser-Exposition zeigten ebenfalls eine Freisetzung von TNF- $\alpha$  (Choe et al. 1997). Beide Substanzen führen beim Menschen zur Ausbildung einer interstitiellen Lungenfibrose.

Von den untersuchten Materialien konnte nur für Titandioxid eine gesteigerte Expression von TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden (Abbildung 24, 46). Es bestand eine Dosisabhängigkeit in beiden Zelllinien. Die Freisetzung von TNF- $\alpha$  wurde noch durch IFN- $\gamma$  gesteigert. Überraschenderweise war die von R2-Makrophagen freigesetzte Menge an TNF- $\alpha$  nach Exposition mit Titandioxid deutlich höher als die nach Exposition mit Asbestfasern bzw.  $\alpha$ -Christobalit. Es stellt sich hier die Frage, ob die in den Versuchen gleichgesetzte Masse der Fasern und Partikel ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), eine solche vergleichende Aussage zulässt. Auf

die Vergleichbarkeit der eingesetzten Materialien bezüglich der Dimensionen wie Länge, Breite und Durchmesser wird später noch eingegangen.

Die Ergebnisse unterstreichen ein pathogenes Potential von Titandioxid, wie auch die Arbeiten von Drumm et al. (1998, 1999) zeigen. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß nach Stimulation humaner Alveolarmakrophagen mit Titandioxid ein Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 resultierte.

Partikel aus Titandioxid sind im Gegensatz zu Keramikfasern, Glaswolle und Steinwolle in der Lage, die Freisetzung von TNF- $\alpha$  aus Makrophagenzelllinien zu induzieren. Es wäre denkbar, daß damit bereits ein Marker für die Pathogenität dieses Materials gefunden wurde.

Bei der Betrachtung der Fasern und Partikel zeigte sich, daß es nicht nur Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung gibt. Die untersuchten Materialien weisen signifikante Abweichungen in den Dimensionen Länge, Breite, Durchmesser und Oberfläche auf. Schon bei der lichtmikroskopischen Betrachtung fällt auf, daß die Dosierung Masse/cm<sup>2</sup> ein wenig geeignetes Maß für die Vergleichbarkeit der Materialien darstellt. Vergleicht man z.B. Glaswolle (Abbildung 64) mit Titandioxid (Abbildung 61) bei einer Dosierung von 50 µg/cm<sup>2</sup> nach Inkubation mit den Makrophagenzelllinien, so sieht man, daß die Zellen mit Titandioxid nahezu vollständig ausgefüllt sind. Bei Glaswolle gibt es relativ wenige Fasern, da diese deutlich größer sind und eine größere Masse pro Faser besitzen. Somit können auch nur weniger Zellen mit Glaswolle interagieren. In den Arbeiten von Blackford et al (1997) wird bereits auf dieses Phänomen hingewiesen. Die Autoren stellten fest, daß die Anzahl der Partikel ein besseres Maß für die Pathogenität der Stäube darstellte als deren Masse. Aus diesem Anlaß ermittelten wir die so genannten phagozytierbaren Einheiten (pE). Dies sind Konglomerate aus kleinen Untereinheiten, die sich durch physikalischen Methoden (Ultraschall) nicht mehr weiter trennen ließen. Bei gleichgesetzter pE ist die Anzahl der Zell-Faser/Partikel-Interaktionen in jedem Ansatz gleich. Unter diesen Bedingungen sollten nun erneut die Zelllinien stimuliert und auf die Produktion mit TNF- $\alpha$  untersucht werden (Abbildung 69). Bei den Messungen von TNF- $\alpha$  im Kulturüberstand der NR8383-Makrophagen fiel überraschenderweise auf, daß die Zellen, die durch Steinwolle mit und ohne

IFN- $\gamma$  stimuliert wurden, am stärksten mit der Freisetzung dieses proinflammatorischen Zytokins reagierten. Weniger ausgeprägt war die TNF- $\alpha$  Induktion durch  $\alpha$ -Christobalit, Keramikfasern und Glaswolle. Im Unterschied dazu reagierten R2-Makrophagen nur nach Stimulation mit  $\alpha$ -Christobalit, und zwar unabhängig von IFN- $\gamma$  Kostimulation, mit der Freisetzung von TNF- $\alpha$  (Abbildung 72).

Alle Fasern sind in der Lage, TNF- $\alpha$  durch Makrophagenzelllinien freizusetzen. Titandioxid wies diese Eigenschaft erst in höheren Dosierungen (pE) auf. Da TNF- $\alpha$  ein wichtiger Faktor in der Fibroseentstehung der Pneumokoniosen spielt, sind möglicherweise alle Materialien in der Lage, eine solche zu induzieren.

In vivo gibt es Hinweise darauf, daß die Größe der Fasern eine bedeutsame Rolle spielt. Gelzleichter et al. (1999) zeigten, daß sich lange Keramikfasern ( $> 5 \mu\text{m}$ ) im Pleuraspalt von Hamstern anreicherten und dort eine fibrotische Reaktion provozierten. Im Gegensatz dazu fand man in Ratten, die keine Pleurafibrose aufwiesen, im Pleuraraum nur wenige lange Keramikfasern. Die Autoren postulierten für lange Fasern die Induktion einer Pleuritis, einen Anstieg des Zellumsatzes der Mesothelien und eine Pleurafibrose. Kurze, dünne Fasern, die in beiden Spezies gleich verteilt waren, sollten für die akute Entzündungsreaktion der Lunge verantwortlich sein, die sowohl in Ratten als auch in Hamstern ähnlich verlief. Ruegger M (1996) zeigte, daß Fasern, die in die Peripherie der Atemwege gelangen können, eine Länge von mehr als  $5 \mu\text{m}$ , einen Durchmesser von weniger als  $3 \mu\text{m}$  und ein Verhältnis der Länge zum Durchmesser von größer gleich 3 besitzen müßten. Die Ergebnisse in der Literatur sind widersprüchlich, sie weisen aber darauf hin, daß die Faktoren Größe, Länge, Masse und Oberfläche eine wichtige Rolle in der Pathogenität der Materialien spielen. Die Ergebnisse in unserer Arbeit bestätigen den unterschiedlichen Einfluß der o.g. Faktoren. Zum Beispiel werden für Titandioxid zwei Formen in der Literatur unterschieden: ultrafeine Partikel ( $\approx 20 \text{ nm}$ ) und feine Partikel ( $\leq 200 \text{ nm}$ ). Ultrafeine Partikel waren in der Lage eine stärkeres Entzündungsbild in der BAL von Versuchstieren hervorzurufen. Auch war die Translokationsrate dieser Partikel in das Interstitium ausgeprägter

als die für die größeren Partikel (Oberdorster et al. 1992). Im Gegensatz zu feinen Partikeln konnten ultrafeine Partikel in Tracheen von Ratten direkt und ohne die Unterstützung immunologischer Zellen eine fibrotische Reaktion hervorrufen. Dies war der Beweis, daß chemisch identische Materialien, die sich ausschließlich in ihrer Größe unterschieden, unterschiedliche Effekte provozieren konnten (Churg et al. 1999). Die Größe allein macht allerdings nicht alle Unterschiede aus. Die Instillation von ultrafeinem Kobalt, Nickel, Siliziumdioxid und Titandioxid in Ratten zeigte, daß Nickel die stärkste Entzündungsreaktion in der Lunge hervorrief. Die Abstufung dieser Materialien deckte sich mit der Fähigkeit, freie Radikale generieren zu können (Zhang et al. 1998).

Auch in unseren Arbeiten wurde die Fähigkeit der eingesetzten Materialien, Makrophagen zur Freisetzung von NO Radikalen anzuregen, untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß beide Zelllinien nach Asbestexposition NO produzierten (Abbildung 23, 45). R2-Makrophagen setzten dieses allerdings nur nach endogenem Priming mit IFN- $\gamma$  frei, während NR8383-Makrophagen auch ohne IFN- $\gamma$  eine dosisabhängige NO-Produktion aufwiesen. Bestätigt werden die in vitro Ergebnisse durch die Arbeiten von Choe et al. (1997). Die Arbeitsgruppe konnte eine gesteigerte Freisetzung von NO durch Pleuramakrophagen der Ratte nachweisen, nachdem die Tiere zuvor Asbestfasern inhaliert hatten. Bei unseren Untersuchungen fiel auf, daß die NO-Produktion bei hohen Asbestfaserkonzentrationen in Kombination mit IFN- $\gamma$  wieder abfiel. Die ausgeprägte Zytotoxizität von Asbestfasern für NR8383-Makrophagen ist eine Erklärung für den Abfall der NO-Bildung bei hohen Konzentrationen von Asbestfasern und IFN- $\gamma$ .

Auch  $\alpha$ -Christobalit führte nach Kostimulation mit IFN- $\gamma$  zu einem Anstieg von NO im Kulturüberstand beider Zelllinien (Abbildung 19, 42). Diese Ergebnisse werden durch die Arbeiten von Castranova et al. (1998) bestätigt. Diese beschreiben ebenfalls die Notwendigkeit eines Kostimulus für die NO-Produktion durch Alveolarmakrophagen, die mit Siliziumdioxid in Kontakt kamen. In der Pathogenese der Silikose kommt iNOS bzw. NO möglicherweise eine bedeutsame Rolle zu. Im Rattenmodell konnte nach Staubexposition ein Zusammenhang zwischen der Induktion von iNOS, der Anzahl der in der BAL nachweisbaren Neutrophilen sowie der Zunahme der Permeabilität



nachgewiesen werden. Castranova et al. (1998) zeigten, daß diese Veränderungen abhängig vom untersuchten Material waren. Siliziumdioxid wies die ausgeprägtesten Veränderungen auf. Es folgte Kohlenminenstaub, Eisencarbonat und zuletzt Titandioxid mit der geringsten Potenz.

In unserem in vitro Modell stellte sich die Eigenschaft von Titandioxid eine Freisetzung von NO in Makrophagen zu induzieren anders dar. Bei der Stimulation der NR8383-Makrophagen und auch der R2-Makrophagen konnte ein signifikanter, dosisabhängiger Anstieg der NO-Freisetzung nach Kostimulation der Zelllinien durch Titandioxid mit IFN- $\gamma$  gezeigt werden (Abbildung 18, 41). Lange Zeit galt Titandioxid als biologisch inerte Substanz. Unsere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, daß es zur Bildung von Radikalen bei der Interaktion von Titandioxid mit Makrophagen kommt. Somit kann ein mögliches pathogenes Potential für dieses Material nicht mehr ausgeschlossen werden. Gleiches wird auch durch Afaq et al. (1998) beschrieben. Diese Arbeitsgruppe konnte eine Zunahme der Expression antioxidativer Enzyme in Alveolarmakrophagen nach intratrachealer Instillation von Ultrafeinem Titandioxid feststellen. Durch diese Ergebnisse muß man davon ausgehen, daß Titandioxid akute Entzündungsreaktionen in der Lunge provozieren kann.

Interessanterweise konnte nach Stimulation mit Keramikfasern (Abbildung 20), Glaswolle (Abbildung 21) und Steinwolle (Abbildung 22) ebenfalls eine Steigerung der NO-Bildung durch NR8383-Makrophagen nach endogenem Priming mit IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden (Keramikfasern > Steinwolle = Glaswolle). In den Versuchen mit R2-Makrophagen zeigte sich im Gegensatz dazu nur ein geringer Anstieg der Konzentration von NO nach Inkubation der Zelllinie mit Glaswolle (Abbildung 44) und Keramikfasern (Abbildung 43) und das auch nur nach Kostimulation mit IFN- $\gamma$ . Dies zeigt erneut, daß die Zelllinien unterschiedlich auf die Stimulation reagierten.

In den Testreihen in denen wir nicht die Masse/cm<sup>2</sup> sondern die pE gleichsetzten kam es zu folgenden Ergebnissen. Alle eingesetzten Materialien außer Glaswolle waren in der Lage, NR8383-Makrophagen zu einer Produktion von NO-Radikalen anzuregen (Abbildung 68). IFN- $\gamma$  konnte den Effekt noch steigern. Auffällig bei diesem Versuchsansatz war jedoch, daß die Negativkontrolle mit IFN- $\gamma$  und PBS w Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> bereits sehr hohe Konzentrationen von NO aufwies. Möglicherweise waren die Zellen hier bereits

voraktiviert.

Eindeutiger war das Ergebnis bei der Stimulation der R2-Makrophagen (Abbildung 72).  $\alpha$ -Christobalit führte zu einer signifikant gesteigerten Freisetzung von NO in der Kostimulation mit IFN- $\gamma$ . Alle anderen Materialien führten ebenfalls nach dem endogenem Priming mit IFN- $\gamma$  zu einer erhöhten Konzentration an produziertem NO.

Die Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, daß alle eingesetzten Stäube ein pathogenes Potential aufwiesen. Betrachtet man nur die Ergebnisse der R2-Makrophagen, so ergibt sich eine für die Materialien Titandioxid, Steinwolle, Glaswolle und Keramikfasern nahezu gleiche Wirkung auf die Freisetzung der NO-Radikale.  $\alpha$ -Christobalit ist mit Abstand der stärkste Induktor der Bildung von NO. Möglicherweise ist das Ausdruck für die hohe Pathogenität von Siliziumdioxid-Partikeln. In den Arbeiten von Blackford et al. (1997), in denen Ratten intratracheal Siliziumdioxid, Titandioxid u.a. Substanzen instilliert wurde, kommen die Autoren zu ähnlichen Ergebnissen. Wurde nicht die Masse der Materialien sondern die Partikelzahl berücksichtigt, so war hier Siliziumdioxid ebenfalls ein stärkerer Induktor einer Entzündungsreaktion und Bildung von NO als Titandioxid. Die Autoren schreiben NO eine wichtige Rolle in der frühen Schädigung der Lunge durch entzündliche Prozesse zu. Folglich sind nach unseren Ergebnissen, alle untersuchten Fasern und Partikel, wenn auch in unterschiedlicher Stärke, in der Lage, eine akute Entzündungsreaktion in der Lunge hervorzurufen.

Möglicherweise spielen neben der chemischen Zusammensetzung und der Dosis noch weitere Parameter eine bedeutsame Rolle. So konnten Warshawski et al. in ihren Untersuchungen (1994) zeigen, daß neben der Dosis auch die Oberfläche und die Oberflächenstruktur wichtige Determinanten in der Zytotoxizität verschiedener Materialien für Hamster- und Ratten-Alveolarmakrophagen waren. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, daß das zytotoxische Potential der Fasern und Partikel ebenfalls einen Einfluß auf das Entzündungsgeschehen in der Lunge hat. Afaq et al. (1998) konnten in ihren Untersuchungen zeigen, daß intratracheal appliziertes Asbest zu einem Anstieg der LDH in der durch BAL gewonnenen Flüssigkeit führte.

In unseren Versuchen konnte für die NR8383-Makrophagen eindeutig eine dosisabhängige Toxizität von Asbest nachgewiesen werden (Abbildung 17).

Diese zeigte sich in einer Zunahme der LDH-Freisetzung in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge der Asbestfasern. R2-Makrophagen reagierten ebenfalls mit einem Anstieg der LDH-Konzentration (Abbildung 40), der aber geringer ausfiel als bei den NR8383-Makrophagen.

Als zweite Positivkontrolle wurde  $\alpha$ -Christobalit eingesetzt. In den eingesetzten Konzentrationen konnte kein signifikanter Anstieg der LDH-Aktivität gemessen werden. Obschon es hinreichend bekannt ist, daß Siliziumdioxid zytotoxische Eigenschaften aufweist, waren die verwendeten Konzentrationen in unseren Versuchen zu gering, um solche Effekte zu provozieren.

Vergleicht man die Ergebnisse mit denen der zu untersuchenden Materialien, so zeigt sich, daß nur für Steinwolle ein ähnlicher dosisabhängiger Effekt auf die Zytotoxizität von Makrophagen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 39). Dieser Effekt zeigte sich vor allem nach Kostimulation mit IFN- $\gamma$  und auch nur bei den R2-Makrophagen. Alle anderen Materialien hatten in den eingesetzten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluß auf die Vitalität der Zellen. Aus diesen Befunden lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen. 1) Die Stimulation der Zelllinien erfolgte in unserer Testreihe mit Ausnahme von Steinwolle und Asbestfasern in einem Dosisbereich der unterhalb der Toxizitätsschwelle lag. 2) Es bestand eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Zelllinien für die eingesetzten Stimuli.

Da für Asbest eine Dosisabhängigkeit der Toxizität nachgewiesen werden konnte, ist nicht auszuschließen, daß auch die anderen Materialien zytotoxische Eigenschaften aufweisen und lediglich die eingesetzten Konzentrationen zu niedrig waren. Diese These wird durch die Ergebnisse des MTT-Tests gestützt, in dem gezeigt werden konnte, daß es ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  bei allen Fasern/Partikeln (bis auf Keramikfasern) zumindest zu einem tendenziellen Abfall der Stoffwechselaktivität der R2-Makrophagen kam (Abbildung 11 - 16). Partuell bestätigt werden die Ergebnisse durch die Arbeitsgruppe um Ruotsalainen, die nachweisen konnte, daß Keramikfasern, im Gegensatz zu Quarz und Chrysotil, keinen toxischen Einfluß auf die untersuchten Zielzellen hatte. In diesem Fall wurden humane Blutleukozyten und Erythrozyten eingesetzt (Ruotsalainen et al. 1999).

Bei gleichgesetzten pE der Materialien zeigte sich sowohl für die NR8383-Makrophagen als auch für die R2-Makrophagen eine ausgeprägte

Toxizität von  $\alpha$ -Christobalit. Während die anderen Materialien in der Testreihe mit R2-Makrophagen keine höheren Konzentrationen an LDH als die Kontrollen erzeugten, fällt bei den NR8383-Makrophagen auf, daß Steinwolle, Keramikfasern und auch Glaswolle die Vitalität der Zellen negativ beeinträchtigten (Abbildung 67, 71). Es lässt sich somit sagen, daß alle eingesetzten Fasern und Partikel in der Lage sind, zytotoxische Reaktionen auszulösen. Die Dosis stellt eine entscheidende Größe dar. Der Grad der Zytotoxizität ist abhängig von der eingesetzten Zellpopulation. Die Mechanismen hierfür sind im einzelnen noch unzureichend untersucht. Aus unseren Ergebnissen lässt sich jedoch sagen, daß der Grad der Zytotoxizität weder direkt mit der Bildung von NO-Radikalen noch mit der Freisetzung von TNF- $\alpha$  einhergeht.

Insbesondere in der Entstehung der akuten Erkrankungsform der Pneumokoniosen scheint der Grad der Zytotoxizität eine Rolle zu spielen. Durch die Zerstörung der Membranintegrität der Makrophagen könnten im Zytosol gespeicherte Mediatoren freigesetzt werden, die ihrerseits weitere Entzündungskaskaden in Gang setzen können. Der Grad der Zytotoxizität ist daher ein weiteres Merkmal, daß über die Pathogenität von MMVF Aufschluß geben kann.

Ein Beispiel für die Freisetzung von intrazellulär gespeicherten Molekülen ist das MCP-1. MCP-1 gehört zur Gruppe der Chemokine, die v.a. auf Monozyten, Lymphozyten (einschließlich NK Zellen), basophile und eosinophile Granulozyten wirken (Schall et al. 1994). Die Stimulation von Monozyten mit MCP-1 induziert die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und die Produktion von IL-1 und IL-6 (Jiang et al. 1992).

Setzt man die Masse/cm<sup>2</sup> bei der Stimulation der NR8383-Makrophagen mit Asbestfasern gleicht, zeigte sich eine vermehrte Freisetzung von MCP-1, welche sich in der Kostimulation mit IFN- $\gamma$  nicht mehr nachweisen ließ (Abbildung 28). Auffällig ist bei diesem Ergebnis allerdings die hohe Konzentration des Chemokins bereits in den Kontrollen. Bei der Charakterisierung der Zellen war dies bereits beschrieben worden. Die Ursache hierfür ist unklar. In der Tendenz zeigt sich jedoch ein ähnliches Ergebnis für die R2-Makrophagen (Abbildung 50).

Bei  $\alpha$ -Christobalit, der zweiten Positivkontrolle (Masse/cm<sup>2</sup>), zeigten die

Makrophagenzelllinien nach Stimulation mit und ohne IFN- $\gamma$  keinen signifikanten Unterschied in der Freisetzung von MCP-1 im Vergleich zu den Kontrollen.

Bei R2-Makrophagen (gleichgesetzte pE) war  $\alpha$ -Christobalit der stärkste Stimulus für die Freisetzung von MCP-1. Weniger ausgeprägt war der Konzentrationsanstieg nach der Stimulation mit Keramikfasern und Steinwolle. Titandioxid und Glaswolle hatten keinen Einfluß auf dieses Chemokin (Abbildung 74). Im Unterschied dazu war Steinwolle für die NR8383-Zellen der stärkste Induktor der MCP-1-Produktion. Bei Steinwolle fiel der Anstieg größer aus als bei  $\alpha$ -Christobalit und Keramikfasern. Titandioxid und Glaswolle zeigten auch hier keinen Einfluß auf die Produktion von MCP-1 (Abbildung 70).

Da beide Zelllinien relativ hohe Spontansekretionsraten von MCP-1 aufwiesen (NR8383-Makrophagen > R2-Makrophagen), ist es schwierig die Ergebnisse zu interpretieren. Des weiteren konnten teilweise nur tendenzielle Konzentrationsunterschiede von MCP-1 gemessen werden. Hinzu kommt, daß es in der Literatur keine Daten in Bezug auf die Freisetzung von MCP-1 gibt. Vergleichen kann man die Ergebnisse somit nur mit den Untersuchungen von Driscoll et al. (1993), die die Freisetzung von MIP (einem weiteren Chemokin) nach Instillation von Siliziumdioxid und Titandioxid bestimmten. Für beide Substanzen konnten sie einen Anstieg des Chemokins nachweisen.

In der Interpretation der Ergebnisse ist der Einfluß der Fasern und Partikel auf die Vitalität der Makrophagen zu berücksichtigen. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Freisetzung von MCP-1 ist, daß dieses Chemokin intracellulär gespeichert wird. Neben spezifischen Mechanismen für die Freisetzung von MCP-1 ist die letale Schädigung der Zellen durch Partikelkonzentrationen im toxischen Bereich eine Form, in der dieses Chemokin freigesetzt werden kann. Neben der direkten Aktivierung des Komplementsystems im Rahmen der akuten Silikose (siehe Einleitung) scheint hier aber ein weiterer Weg aufgezeigt zu sein, wie Entzündungszellen in die Lunge rekrutiert werden. Folglich ist MCP-1 eine weitere Determinante in der Pathogenese der Pneumokoniosen. Neben Asbest und  $\alpha$ -Christobalit weisen folglich auch Steinwolle und Keramikfasern ein krankheitsverursachendes Potential auf.

Bisher konnte gezeigt werden, daß sich die eingesetzten Makrophagenzelllinien

in einigen Reaktionen voneinander unterschieden. Die unterschiedliche Gewebeherkunft mag hier eine Erklärung darstellen. Speziesunterschiede zwischen Ratte und Mensch müssen jedoch ebenso in der Interpretation der Ergebnisse Berücksichtigung finden. Möglicherweise reagieren Monozyten bzw. Makrophagen des Menschen unterschiedlich im Vergleich zu den Pleura- und Alveolarmakrophagenzelllinien der Ratte. In der Literatur gibt es bereits Hinweise, die auf das Vorliegen von speziesspezifischen Reaktionen im Hinblick auf die Empfindlichkeit für bestimmte Materialien hinweisen (Gelzleichter et al. 1999). Deshalb wurden ergänzend Untersuchungen an humanen Blutmonozyten durchgeführt. Außerdem sollte analysiert werden, ob die Ergebnisse, die wir an Zelllinien gewonnen hatten, auf primäre Zellen übertragbar sind.

Untersucht man die Toxizität der Materialien für die unterschiedlichen Zellsysteme kommt man zu dem Ergebnis, daß von allen hier eingesetzten Zellen NR8383-Makrophagen am empfindlichsten auf Asbestfasern reagierten. In absteigender Reihenfolge kommen R2-Makrophagen und schließlich die primären Monozyten (Abbildung 17, 40, 57). Im Gegensatz zu den Makrophagenzelllinien reagierten die primären Monozyten mit einer signifikanten Abnahme der Vitalität nach der Stimulation mit  $\alpha$ -Christobalit. Dies zeigte sich auch bei Titandioxid.

Kim et al. (1999 und 2001) wiesen in ihren Arbeiten darauf hin, daß es unterschiedliche Mechanismen gibt, durch die Zytotoxizität durch Fasern und Partikel vermittelt wird. Für Siliziumdioxid spielt z.B. die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen eine entscheidende Rolle (Zang et al. 2000). Im Einzelnen sind die Mechanismen durch die Zellschäden verursacht werden aber noch unvollständig verstanden. Es ist denkbar, daß bestimmte Zellpopulationen anfälliger für solche Mechanismen sind als andere. Warum reagieren Makrophagen und Monozyten unterschiedlich empfindlich auf die Stimulation mit Fasern und Partikeln? Sicherlich spielt hier die Gewebeherkunft eine Rolle. Alveolarmakrophagen besitzen andere Fähigkeiten und Aufgaben als Pleuramakrophagen und Blutmonozyten, z.B. durch ihre Reinigungsfunktion der Lunge.

Untersucht man die Eigenschaften von Monozyten, so findet man weitere

Hinweise für die Bedeutung der Gewebeherkunft sowie der Spezies bei der Untersuchung der biologischen Reaktivität der Fasern und Partikel in einem in vitro Testsystem. Von Monozyten weiß man, daß sie im Gegensatz zu Makrophagen nur geringe Mengen NO produzieren. Bereits in den Vorversuchen (Daten hier nicht gezeigt) konnten die humanen Zellen durch die Stimulation mit IFN- $\gamma$  und LPS nicht zu einer messbaren Produktion von NO angeregt werden. In den Stimulationsreihen mit den Faser-/Partikelpräparationen konnte ebenfalls kein Anstieg der NO Produktion gemessen werden. Während die Zelllinien der Ratte dosisabhängig NO produzierten, galt dies nicht für humane Monozyten.

Nach der Stimulation mit LPS und IFN- $\gamma$  reagierten die humanen Monozyten wie erwartet mit einer ansteigenden Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Daten hier nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den Makrophagenzelllinien erfolgte jedoch nach Stimulation der Monozyten durch die Fasern und Partikel mit und ohne IFN- $\gamma$  keine Freisetzung der oben genannten Mediatoren. Während die Bildung von TNF- $\alpha$  durch Makrophagenzelllinien als ein möglicher Pathogenitätsmarker galt, zeigte sich in den Versuchen mit Monozyten keine Beeinflussung dieses Zytokins. Anhand der Datenlage kann man über die Ursachen nur spekulieren. Möglicherweise handelt es sich hier um einen Speziesunterschied zwischen Mensch und Ratte. Man muß allerdings auch berücksichtigen, daß es sich um Blutmonozyten handelt, die sich erst zu Makrophagen ausdifferenzieren. Folglich kann es sich auch hier wieder um einen Unterschied handeln, der durch die Gewebeherkunft bedingt ist.

#### **4.2. Einflußgrößen der Pathogenität**

Betrachtet man die chronischen Verlaufsformen der Pneumokoniose, so ist die Verweildauer der Partikel und Fasern im menschlichen oder tierischen Organismus, die sog. Biopersistenz, eine entscheidende Einflußgröße. Damit es zu einer chronischen Lungenerkrankung kommen kann, ist es notwendig, daß die Materialien dauerhaft in der Lunge und im Organismus persistieren. Oberdorster (2002) teilt diesbezüglich Fasern und Partikel in 2 Gruppen ein. Biopersistente Fasern, welche innerhalb einer bestimmten Zeitperiode nicht in

der Lunge aufgelöst bzw. eliminiert werden können, sowie biolösliche Fasern, bei denen sogar lange, nicht phagozytierbare Fasern rasch aus der Lunge eliminiert werden. Die Biopersistenz setzt sich aus den Determinanten Löslichkeit, Clearance durch Alveolarmakrophagen sowie Translokationsrate in das Interstitium zusammen. Diese sollen im Folgenden weiter erläutert werden. Eine Eigenschaft der biopersistenten Fasern und Partikel ist es, sich unzureichend im Milieu der Lunge aufzulösen. Hierfür wurde der Ausdruck „poor soluble particle“ (PSP) geprägt. Je weniger sich die Substanz in der Lunge löst, desto größer ist die Biopersistenz.

Die Translokation von Fasern und Partikel in das Interstitium ist bereits in der Pathogenese der Silikose beschrieben worden. Insbesondere ultrafeine Stäube weisen eine hohe Translokationsrate in das Interstitium auf. Dies sind Stäube von einer Größe von  $<100$  nm. Von dieser Staubfraktion weiß man (Oberdorster 2001), dass sie der Phagozytose durch Alveolarmakrophagen entgehen und somit direkt in das Interstitium gelangen können. Eine hohe Translokationsrate geht mit einer hohen Biopersistenz einher.

Die Bronchoalveoläre Clearance unterliegt in Anhängigkeit von der eingesetzten Dosis Schwankungen. In chronischen Inhalationsstudien konnte gezeigt werden, dass es nach Hochdosisapplikation zu einer signifikanten Beeinträchtigung der normalen Clearance-Mechanismen der Alveolarregion kommt. Die Folge ist ein kontinuierlicher Aufbau der Lungenbelastung durch MMVF. Zwar sind dies Effekte, die erst nach hohen Inhalationsdosen eintreten - sie dürfen somit nicht unbedenklich auf den Menschen extrapoliert werden - jedoch geben sie einen wichtigen Hinweis auf die mögliche Pathogenität der MMVF, dadurch, dass sie die Biopersistenz verlängern.

Oberdorster (2000) stellt in seinen Arbeiten fest, dass eine Substanz mit geringer Biopersistenz im Vergleich zu Materialien mit hoher Biopersistenz bei gleicher Dosis und bei chronischer Applikation einen geringeren biologischen Effekt aufweist. In vergleichenden Untersuchungen an männlichen Ratten wird dieser Einfluß bestätigt (Baggs et al. 1997). Nach einer dreimonatigen Exposition der Tiere mit Siliziumdioxid und Titandioxid wurden die Lungen nach 6 und 12 Monaten untersucht. Nach 6 Monaten wiesen beiden Populationen eine moderate fokale interstitielle Fibrose und moderate fokale Alveolitis auf, wobei die durch Siliziumdioxid ausgelösten Läsionen ausgeprägter waren. Nach



einem Jahr war die Fibrose in den Tieren, die Siliziumdioxid ausgesetzt waren, wenn auch vermindert, noch nachweisbar, während sich die Lungen der Titandioxid-exponierten Tiere von denen der Kontrollen kaum noch unterschieden. Möglicherweise ist die verkürzte Biopersistenz eine Erklärung für die Reversibilität der durch Titandioxid verursachten Läsionen.

In unseren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß das Reaktionsmuster der Makrophagen abhängig von unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der MMVF ist. Neben den für die der Biopersistenz verantwortlichen Faktoren, spielen die Größe, Länge, Breite, Dichte und auch die Oberfläche und die Oberflächenbeschaffenheit der Materialien eine entscheidende Rolle. In der Mikroskopie der Zellkulturen, welche mit den Faser- und Partikelpräparationen inkubiert wurden, wurde bereits deutlich, daß die Materialien unterschiedlich mit den Makrophagen interagierten. Während kleine Partikel und Fasern vollständig phagozytiert wurden, kam es bei den langen Fasern nur zu einer Anlagerung der Makrophagen an deren Oberfläche. In unseren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Masse/cm<sup>2</sup> kein geeignetes Parameter ist für solche Versuche ist. Um Ergebnisse vergleichbar machen zu können, sollten in zukünftigen Untersuchungen ausschließlich die pE anstelle der Masse zum Einsatz kommen.

Für in vitro Untersuchungen ist es keine Schwierigkeit, die Zusammensetzung der Stäube dementsprechend zu gestalten. Methodische Schwierigkeiten gibt es jedoch, sobald die Ergebnisse auf eine in vivo Situation übertragen werden sollen. Inhalationsstudien kommen der natürlichen Situation der Staub-Exposition am nächsten. Hier wird die physiologische Filterfunktion des Nasen- Rachenraumes sowie des Bronchialsystems berücksichtigt. Die Verteilung der Stäube innerhalb der Lunge entspricht außerdem den physiologischen Gesetzmäßigkeiten. Die Zusammensetzung der Fasern und Partikel können nicht beliebig verändert werden, sie charakterisieren den Alveolarstaub. Im Gegensatz hierzu stehen die Instillationsstudien. Hier werden in einem Medium dispergierte Fasern und Partikel in die Lungen der Versuchstiere instilliert. Die physiologische respiratorische Situation bleibt hier unberücksichtigt. Man ist zwar in der Lage, die Zusammensetzung der Staubfraktion frei zu wählen, die Verteilung der dispergierten Materialien ist

jedoch ungewiß. Es können sich Cluster von akkumulierten Fasern bilden und unspezifische Reaktionen auslösen. Ein Vorteil ist jedoch, dass der Einfluß langer Fasern, die sonst das Alveolarsystems nicht erreichen würden, untersucht werden kann. Um prinzipielle Mechanismen der Pathogenese der Pneumokoniosen zu verstehen, ist hier ein Vorteil zu sehen.

Ein kompliziertes Wechselspiel multipler Zellpopulationen und deren Syntheseleistungen sind die Voraussetzung für die Entstehung einer Pneumokoniose. Neben den immunkompetenten Zellen, Pneumozyten und Epithelien stehen Makrophagen im Mittelpunkt der Reaktion der Lunge. Sie bilden die erste Abwehrreihe des Organismus und sind in der Lage MMVF zu eliminieren, indem sie sie phagozytieren und nach außen transportieren. Makrophagen weisen als eine Folge von Zelloberflächen Interaktionen, autokriner sowie parakriner Mechanismen, eine ausgeprägte Heterogenität ihres Phänotyps auf. Der Ursprung der Makrophagen ist gut untersucht. Beginnend im Dottersack migrieren die Progenitoren zur fetalen Leber, Milz und in das Knochenmark. Im Fetus proliferieren reife Makrophagen während des Geweberemodellings bei der Organreifung. Später rekrutieren sich die Makrophagen aus Monozyten, welche aus Monoblasten und deren Precursoren heranreifen. In unseren Arbeiten wurden Makrophagenzelllinien der Ratte eingesetzt. Es handelt sich hier um Gewebemakrophagen. Makrophagen weisen in ihren Aufgaben eine große Vielfalt auf. Eine Unterscheidung gelingt durch bestimmte Oberflächenantigene. Makrophagen nehmen Teil an der Produktion, Mobilisation, Aktivierung und Regulation aller immunologischen Effektorzellen. Sie regulieren das lokale und systemische Milieu durch Membranrezeptoren und diverse sekretorische Produkte. Sie reagieren auf und produzieren ihrerseits Signale, die das Wachstum, die Differenzierung und den Tod anderer Zellen beeinflussen (Paul, 1999). Auf die besonderen Aufgaben der dendritischen Zellen, eine Subpopulation der Makrophagen, soll in diesem Zusammenhang hier nicht eingegangen werden. Betrachtet man die unterschiedlichen Organe, in denen Makrophagen lokalisiert sind (Leber, Thymus, Knochenmark, Milz, Lymphknoten), so wird deutlich, daß Makrophagen in Abhängigkeit von deren Herkunft, unterschiedlich auf externe Stimuli reagieren müssen. Über die Einzelheiten der Gewebemakrophagen ist

noch vieles unbekannt. Zweifelsohne gibt es gewebespezifische Unterschiede in der Phagozytose sowie in der Produktion immunmodulatorischer Substanzen. In unseren Untersuchungen wurden Gewebemakrophagen der Pleura und der Alveolen eingesetzt. Pleuramakrophagen bewegen sich in einem sterilen Kompartiment, während Alveolarmakrophagen kontinuierlich mit Mikroorganismen u.a. Noxen in Wechselwirkung treten. Die Ergebnisse unserer Arbeit bestätigen die Vermutung, daß Gewebemakrophagen unterschiedlich reagieren. Die Pleuramakrophagenzelllinie erwies sich als resistent gegen die toxischen Einflüsse durch Fasern und Partikel. Im Vergleich zu den Alveolarmakrophagen konnte kein bzw. nur ein geringer Anstieg des freigesetzten LDH registriert werden. Alveolarmakrophagen erwiesen sich in unseren Untersuchungen als reaktionsfreudiger in Bezug auf die Produktion und Freisetzung der untersuchten Substanzen. So konnte gezeigt werden, dass bis auf Titandioxid, alle Substanzen zur Freisetzung von NO-Radikalen führten. Die Berücksichtigung der Gewebeherkunft der Makrophagen ist daher für die Beurteilung der in vitro Ergebnisse erforderlich, möglicherweise sind Alveolarmakrophagen für einen in vitro Assay nützlicher, da sie auf externe Stimuli stärker reagieren.

Barrett et al. (1999) kommen in ihren Arbeiten zu dem Ergebnis, dass die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch die Zelllinie der Maus RAW 264.7 zumindest teilweise abhängig von oxidativem Streß nach Exposition mit Siliziumdioxid ist. Dabei wurde unter anderem die Synthese von MCP-1 mRNA untersucht. Nach Stimulation mit Christobalit war diese erhöht. Im Einklang damit steht auch unser Ergebnis mit humanen Monozyten. Sowohl für Asbest, Christobalit als auch für Titandioxid konnte bei gleichgesetzter Masse/cm<sup>2</sup> eine Steigerung der Freisetzung von MCP-1 nachgewiesen werden. Die hohe Basissekretion durch die von uns eingesetzten Makrophagenzelllinien steht hierzu jedoch im Widerspruch. Wir vermuten, dass es sich um eine Eigenschaft der beiden Zelllinien handelt, die sich diesbezüglich unterschiedlich zu denen primärer Zellen verhalten. Erneut spiegeln sich hier die besonderen Eigenschaften der Zielzellen wider.

In den Untersuchungen an humanen Blutmonozyten konnte weder eine Produktion von NO-Radikalen noch eine Freisetzung von TNF- $\alpha$  nach Stimulation mit den Kontrollmaterialien Asbest und Christobalit nachgewiesen

werden. Für einen in vitro Assay sind humane Monozyten somit nicht geeignet. Alveolarmakrophagen sollten entweder als Zelllinie oder primäre Zellen zum Einsatz kommen.

#### **4.3. Fazit**

Unsere Untersuchungen haben ergeben, dass Glaswolle, Steinwolle, Titandioxid und Keramikfasern eine proinflammatorische Reaktion der Makrophagenzelllinien hervorrufen konnten. Auch Thurlbeck und Churg (1995) gehen davon aus, daß alle Stäube, abhängig von der Dosis und Dauer der Exposition potentiell in der Lage seien, eine Fibrose zu induzieren. Es gäbe folglich keinen wirklich inerten Staub.

Eine Klassifikation der Materialien anhand der gewonnenen Ergebnisse ist jedoch schwierig, da die Fasern und Partikel unterschiedliche Wirkungen auf die verschiedenen immunologischen Parameter aufweisen. Erst ein Vergleich mit in vivo Analysen kann zeigen, welche Parameter am besten mit den pathologischen Veränderungen korrelieren.

Um die biologische Gefährdung des Menschen einschätzen zu können, müssen außerdem Untersuchungen über die Biopersistenz der Fasern und Partikel folgen. Hierfür sind ebenfalls in vivo Studien notwendig.

Für ein standardisiertes Testsystem sind nicht die Masse/cm<sup>2</sup>, sondern die pE, gleichzusetzen. Das Wissen über die immunologische Reaktivität und die Biopersistenz der MMVF wird in Zukunft eine Vorhersage über die gesundheitlichen Folgen für den Menschen anhand eines in vitro Testsystems erlauben.

## 5. Zusammenfassung

Mineralische Fasern finden seit Jahren weltweiten Einsatz als Ersatzstoffe für Asbest, dessen biologische Potenz in der Induktion von Asbestose und Neoplasien hinreichend bekannt ist und dazu geführt hat, daß Asbest zunehmend durch andere Materialien ersetzt wurde. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß solcher Ersatzmaterialien wie Titandioxid, Keramikfasern, Glaswolle und Steinwolle auf Makrophagen und deren Reaktion auf diesen Reiz zu beschreiben, zu analysieren und somit möglichst eine Aussage über die Pathogenität der eingesetzten Materialien treffen zu können. Untersucht wurde der Einfluß der Materialien auf die Vitalität der Zellen und die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1, sowie die Bildung von NO durch Makrophagen.

In meiner Arbeit wurden die Pleuramakrophagenzelllinie R2 sowie Alveolarmakrophagenzelllinie NR8383 der Ratte eingesetzt. Um herauszufinden, ob die Zelllinien für die folgenden Untersuchungen geeignet waren, erfolgte zunächst deren Charakterisierung. Hierfür wurden die Zelllinien mittels LPS und IFN- $\gamma$  in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. LPS war in der Lage, beide Zelllinien zu einer gesteigerten dosisabhängigen Produktion von NO, TNF- $\alpha$ , MCP-1 sowie IL-1 $\beta$  anzuregen. IFN- $\gamma$ , als endogener Stimulus, hatte allein kaum Einflüsse auf die Expression dieser Mediatoren. In der Kostimulation erfolgte aber für die Bildung von NO eine überadditive Steigerung der LPS-induzierten Freisetzung. TNF- $\alpha$ , MCP-1 und IL-1 $\beta$  wurden durch geringe Konzentrationen von IFN- $\gamma$  (1 U/ml) nach Gabe von LPS noch verstärkt freigesetzt. In höheren Konzentrationen (10, 100 U/ml) hatte IFN- $\gamma$  allerdings einen hemmenden Einfluß auf die LPS-induzierte Freisetzung. Unter Berücksichtigung der Literatur weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß sowohl die Alveolarmakrophagenzelllinie NR8383 als auch die Pleuramakrophagenzelllinie R2 typische Eigenschaften von primären Makrophagen aufwiesen und somit für die Experimente geeignet waren.

Nach 24-stündiger Stimulation der Makrophagenzelllinien mit den eingesetzten Fasern und Partikeln in den Konzentrationen 2, 10 und 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  wurde die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen untersucht. Als Positivkontrolle kamen  $\alpha$ -Christobalit (Silikapartikel) sowie Chrysotil (Asbestfasern) zum

Einsatz. Die Ergebnisse zeigten vor allem für Titandioxid eine besondere biologische Reaktivität auf. In der Mikroskopie konnte jedoch gezeigt werden, dass die eingesetzten Fasern und Partikel sich in den Dimensionen Länge, Breite und Masse maßgeblich unterschieden. Die Anzahl der Zell-Faser- und Partikelinteraktionen war somit sehr unterschiedlich. Um zu vergleichbaren Ergebnissen zu gelangen, wurde in nachfolgenden Untersuchungen im Gegensatz zur Masse/cm<sup>2</sup>, der Einfluß der *Anzahl* der phagozytischen Fasern und Partikel auf die Makrophagenzelllinien untersucht. Wurden die Zelllinien mit der gleichen Menge an phagozytischen Einheiten (pE) mit und ohne IFN- $\gamma$  als Zusatz stimuliert, führten alle verwendeten Fasern zu einer Bildung von NO. Alle Fasern und Partikel außer Titandioxid konnten TNF- $\alpha$  in den Makrophagenzelllinien induzieren. Bis auf Titandioxid und Glaswolle stimulierten die restlichen mineralischen Stoffe die Zelllinien zur Freisetzung von MCP-1. Ein besonderes Problem von in vitro Studien mit Zelllinien stellt die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf primäre Zellen dar. Um zusätzlich auch Speziesunterschiede abzubilden, wurden die Untersuchungen in gleicher Weise an humanen Monozyten durchgeführt, die aus dem „buffy-coat“ von Blutspendern gewonnen wurden. Die Monozyten reagierten auf die Applikation von Titandioxid, Christobalit und Asbest in der Kombination mit IFN- $\gamma$  mit einer gesteigerten Synthese von MCP-1. Da sich die Reaktionen der Makrophagenzelllinien von denen der humanen Monozyten unterschieden, werden hier speziesspezifische und auch gewebespezifische Unterschiede diskutiert. Letzteres wird auch durch die unterschiedliche Reaktion der Pleuramakrophagenzelllinie und der Alveolarmakrophagenzelllinie nach Inkubation mit den Faserpräparationen unterstrichen. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß alle eingesetzten Fasern und Partikel in der Lage waren, eine proinflammatorische Reaktion in Makrophagen und Monozyten hervorzurufen. Prinzipiell stehen somit alle eingesetzten Materialien unter dem Verdacht, eine Pneumokoniose induzieren zu können. Um genauere Vorhersagen über das pathogene Potential der Materialien machen zu können, ist neben der biologischen Reaktivität, die in unserem Testsystem nachgewiesen wurde, die Dauer der Biopersistenz der Materialien von besonderer Bedeutung. Sie setzt sich aus der Clearance der Fasern und Partikel, deren Translokationsrate in das Interstitium und deren Löslichkeit in

der Lunge zusammen. Um die Biopersistenz zu ermitteln, sind in vivo Untersuchungen notwendig. Der in unseren Untersuchungen entwickelte Testansatz könnte in Zukunft die Frage der biologischen Reaktivität von MMVF beantworten und in der Zusammenschau mit der Biopersistenz eine Vorhersage über das pathogenen Potential der eingesetzten Materialien erlauben.

## 6. Abkürzungen

a.-p.	Anterior-Posterior
Ag	Antigen
Aqua dest.	Aqua destilata
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrom (Akutes Atem- notsyndrom des Erwachsenen)
BALT	Bronchus associated lymphatic tissue
BAT	biologische Arbeitsstofftoleranzwerte
CD	Cluster of Differentiation
CSF	Colony stimulating factor (Kolonie stimulierender Faktor)
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERDF	Endothelial Derived Relaxation Factor
EU/ml	Endotoxin Units (Endotoxin Einheiten)
FCS	Fötales Kälber Serum
FGF	Fibroblast-Growth Factor
G	Gravitation = 9,81 m/sec
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor
GW1	Glaswolle
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPETE	Hydroperoxyeicosanotetraenoat
hRPMI <sup>sup</sup>	Humanes Rosewell Park Memorial Institute inklusive AB- Serum
ICAM	Interzelluläre Adhäsionsmoleküle
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin Like Growth Factor
IL	Interleukin
ILO	International Labor Office
ILSI	International Life Sciences Institute
iNOS	Induzierbare Nitrit Oxid Synthase
LAL	Limulus-Amöbocyten-Lysat-Test



LDH .....	Laktat Dehydrogenase
LDH <sub>100</sub> = LDH <sub>max</sub> .....	Maximale Menge LDH, die aus Zellen freigesetzt werden kann
L-Glutamin .....	Levo-Glutamin
LT .....	Leukotrien
M .....	Molar
M. ....	Genus Mykoplasmen
MAK.....	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MCP.....	Macrophage Chemoattractant Protein
MHC .....	Major Histocompatibility Complex
MIP .....	Macrophage Inflammatory Protein
MMVF .....	Man-made vitreous fibers (Synthetisch hergestellte Fasern)
Mn.....	Mangan
MTT .....	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NfkappaB.....	Nuklear factor kappa B
NIOSH .....	National Institute for Occupational Health and Safety
NK.....	Natürliche Killerzellen
OD. ....	optische Dichte
OPD.....	o-Phenylenediamindihydrochlorid
OSHA .....	Occupational Safety and Health Administration
PBS <sup>def</sup> w Ca <sup>++</sup> /Mg <sup>++</sup> .....	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung mit Kalzium und Magnesium
PDGF.....	Plateled Derived Growth Factor
pE .....	phagozytierbare Einheiten
PG .....	Prostaglandin
PMF .....	Massive Progressive Fibrose
POD.....	Peroxidase aus Meerrettich
PSP .....	Poorly soluble particles (schwach lösliche Partikel)
RF1.....	Refractory Fibers (Keramikfasern)
RPMI .....	Rosewell Park Memorial Institute
RPMI <sup>sup</sup> .....	RPMI Inkl. FCS
RW1.....	Rockwool (Steinwolle)
SDS .....	Natriumdodecylsulfat
SO1 .....	Siliziumdioxid
SP-A .....	Surfactant Protein-A

TBS.....	TRIS Buffered Sialine (TRIS gepufferte Kochsalzlösung)
TGF .....	Transforming Growth Factor
TNF.....	Tumor Nekrosis Factor
TO1.....	Titandioxid
TRIS .....	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan, Puffersubstanz
TX.....	Thromboxan
U/min .....	Umdrehung pro Minuten
U/ml .....	Units pro Milliliter
TNF.....	Tumor Nekrose Faktor
IFN.....	Interferon
RANTES .....	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (Chemokin)
GRO .....	Growth-related oncogenes (Chemokin)
BK.....	Berufskrankheit

## 7. Quellenverzeichnis

Absher MP, Hemenway DR, Leslie KO, Trombley L, Vacek P (1992) Intrathoracic distribution and transport of aerosolized silica in the rat. *Experim L. Research*.

Absher MP, Trombley L, Hemenway DR, Mickey RM, Leslie KO (1989) Biphasic cellular end tissue response of rat lungs after eight-day aerosol exposure of the silicon dioxide cristobalite. *Am J Pathol* 134:1243-1251.

Absher PM, Sjostrand M, Baldor LC, Hemenway DR, Kelley J (1993) Patterns of secretion of transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) in experimental silicosis. Acute and subacute effects of cristobalite exposure in the rat. *Reg Immunol* 5:224-231.

Adamson IYR, Letourneau HL, Bowden DH (1991) Comparison of alveolar and interstitial macrophages in fibroblast stimulation after silica and long or short asbestos. *Lab Invest* 64:339-344.

Afaq F, Abidi P, Matin R, Rahman Q (1998) Activation of alveolar macrophages and peripheral blood cells in rats exposed to fibers/particles. *Toxicol Lett* 99:175-182.

Afaq F, Abidi P, Matin R, Rahman Q (1998) Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide. *J Appl Toxicol* 18(5):307-12

Allison AC, Harington JS, Birbeck M. (1966) An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages. *J Exp Med* 124:141-154

Bachwich PR, Chensue SW, Larrick JW, Kunkel SL (1986) Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E2 production in resting macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 136:94-101.

Bagchi N (1992) What makes silica toxic? *Br J Ind Med* 49: 163-166

Baris YI, Artvinli M, Sabin AA (1979) Environmental mesothelioma in Turkey. Ann N Y Acad Sci 330, 423-432.

Barret Egm Johnston C, Oberdorster G, Finkelstein JN (1999) Antioxidant treatment attenuates cytokine and chemokine levels in murine macrophages following silica exposure. Toxicol Appl Pharmacol 158:211-220.

Barrett EG, Johnston C, Oberdorster G, Finkelstein JN (1999) Antioxidant treatment attenuates cytokine and chemokine levels in murine macrophages following silica exposure. Toxicol Appl Pharmacol. 158(3):211-20

Baur X, Latza U, Butz M (2003) Arbeitsbedingte Erkrankungen der Lungen und der Atemwege sowie Neoplasien. Deutsches Ärzteblatt Jg 100 Heft 41:B2217-B2224.

Becklake MR (1983) Occupational lung disease - Past record and future trend using the asbestos case as an example. Clin Invest Med 6:305-317.

Bellman B, Muhle H, Pott F, König H, Kloppel H, Spurny K (1987) Persistence of man-made mineral fibers (MMMF) and asbestos in rat lungs. Ann Occup Hyg 31:693-709.

Bergmann JD, Metker LW, McCain WC, Beall PA, Michie MW, Lee RB (2000) Intratracheal Instillation of Zinc-Cadmium Sulfide (ZnCdS) in Fisher 344 Rats. Inhal Toxicol 12:331-346.

Bigby TD, Holtzman MJ (1987) Enhanced 5-lipoxygenase activity in lung macrophages compared to monocytes from normal subjects. J Immunol 138:1546-1550.

Blackford JA Jr, Jones W, Dey RD, Castranova V (1997) Comparison of inducible nitric oxide synthase gene expression and lung inflammation following intratracheal instillation of silica, coal, carbonyl iron, or titanium dioxide in rats. J Toxicol Environ Health 51(3):203-18

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC (1997) Cellular responses to interferon- $\gamma$ . *Annu Rev Immunol* 15:749-795.

Boillat MA (1999) Synthetic mineral fibers. *Schweiz Med Wochenschr* 129:468-474.

Bowden DH, Hedgecock C, Adamson IYR (1989) Silica-induced pulmonary fibrosis involves the reaction of particles with interstitial rather than alveolar macrophages. *J Pathol* 158:73-80.

Brett J, Gerlach H, Nawroth P, Steinberg S, Godman G, Stern D (1989) Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J Exp Med* 169:1977-1991.

Brieland JK, Flory CM, Jones ML, Miller GR, Remich DG, Warren JS, Fantone JC (1995) Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression and secretion in rat pulmonary alveolar macrophages by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-2 beta. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12:104-109.

Brieland JK, Jones ML, Flory CM, Miller GR, Warren JS, Phan SH, Fantone JC (1993) Expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by rat alveolar macrophages during chronic lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9:300-305.

Brody AR, Roe MW, Evans JN, Davis GS (1982) Deposition and translocation of inhaled silica in rats: quantification of particle distribution, macrophage participation, and function. *Lab Invest* 47:533-542

Brown DM, Fisher C, Donaldson K (1998) Free radical activity of synthetic vitreous fibers: iron chelation inhibits hydroxyl radical generation by refractory ceramic fiber. *J Toxicol Environ Health* 53:545-561.

Brüderle, A (1997) Phänotyp und Funktion der Ratten-Makrophagen-Zelllinie R2. Diplomarbeit, Fachbereich Humanmedizin.

Callis AH, Sohnle PG, Mandel GS, Mandel NS (1986) The role of complement in experimental silicosis. *Environ Res* 40:301-312

Carlberg JR, Crable JV, Limitiaca LP, et al. (1971) total dust, coal, free silica and trace metal concentrations in bituminous coal miners lungs. *Am Indust Hyg Assoc J* 32:432-440.

Carter CM, Axten CW, Byers CD, Chase GR, Koenig AR, Reynolds JW, Rosinski KD (1999) Indoor airborne fiber levels of MMVF in residential and commercial buildings. *Am Ind Hyg Assoc* 60:794-800.

Castranova V, Huffman LF, Judy DJ, Bylander JE, Lapp LN, Weber SL, Blackford JA, Dey RD (1998) Enhancement of nitric oxide production by pulmonary cells following silica exposure. *Environ Health Perspect* 106:1165-1169

Cherniack M (1986) *The Hawk's Nest Incident; Americas's Worst Industrial Disaster*. New Haven, CT: Yale University Press.

Choe N, Tanaka S, Xia W, Hemenway DR, Roggli VL, Kagan E (1997) Pleural Macrophage Recruitment and Activation in Asbestos-induced Pleural Injury. *Environ Health Perspect* 105S(Suppl 5):1257-60

Churg A, Gilks B, Dai J (1999) Induction of fibrogenic mediators by fine and ultrafine titanium dioxide in rat tracheal explants. *Am J Physiol* 277:L975-82.

Churg A, Wright JL (2002) Airway wall remodeling induced by occupational mineral dusts and air pollutant particles. *Chest*.122(6 Suppl):306S-309S

Churg A, Wright JL, Wiggs B, DePaoli L (1989) Mineralogic correlates of fibrosis in chrysotile miners and millers. *Am Rec Respir Dis* 139:891-896.

Claudio E, Segade F, Wrobel K, Ramos S, Lazo PS (1995) Activation of murine macrophages by silica particles in vitro is a process independent of silica-induced cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:547-554.

Costello J, Ortmeier CE, Morgan WKC (1974) Mortality from lung cancer in coal miners: Influence of smoking and dust exposure. *Thorax* 37:760-764.

Cunha FQ, Moncada S, Liew FY (1992) Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- $\gamma$  in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 182:1155-1159.

Dai J, Gilks B, Price K, Churg A (1998) Mineral dusts directly induce epithelial and interstitial fibrogenic mediators and matrix components in the airway wall. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1907-1913.

Dauber JH, Rossman MD, Pietra GG, Jimenez SA, Daniele RP (1980) Experimental silicosis: morphologic and biochemical abnormalities produced by intratracheal instillation of quartz into guinea pig lungs. *Am J Pathol* 101:595-612.

Davis GS, Gems D (1996) Immunopathogenesis of silicosis. *Immunopathology of Lung Disease*. Kradin RL, Robinson BWS, ed. Butterworth-Heinemann, Boston. 445-467.

Davis GS, Hemenway DR, Evans JN et al. (1981) Alveolar macrophage stimulation and population changes in silica-exposed rats. *Chest* 80:8

Davis GS, Hemenway DR, Evans JN, Lapenas SJ, Brody AR (1981) Alveolar macrophage stimulation and population changes in silica-exposed rats. *Chest* 80:8-10

Davis GS, Leslie KO, Schwarz JE, Pfeiffer LM, Hill Eubanks L, Hemenway DR (1993) Altered patterns of lung lymphocyte accumulation in silicosis in cytokine-sufficient (C3H/HeN) and cytokine-deficient (C3H/HeJ-LPSd) mice. *Chest* 103:120-121

Davis GS, Pfeiffer LM, Hemenway DR (1999) Reduced silicosis in interferon- $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) knock-out mice (Abstract) *Am J Respir Crit Care Med* 159:A24.

Davis GS, Pfeiffer LM, Hemenway DR (1998) Persistent overexpression of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in murine silicosis. *Environ Pathol Toxicol Oncol* 17:99-114.

Davis GS, Pfeiffer LM, Hemenway DR (1999) Expansion of interferon- $\gamma$ -producing lung lymphocytes in mouse silicosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:813-824.

Davis GS, Pfeiffer LM, Hemenway DR (1999) Expansion of interferon- $\gamma$ -producing lung lymphocytes in mouse silicosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:813-824.

Davis GS, Pfeiffer LM, Hemenway DR (2000) Interferon- $\gamma$  production by specific lung lymphocyte phenotypes in silicosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:491-501.

De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figfor CG, de Vries JE (1991) Interleukin10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes; an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209-1220.

Denholm EM, Rollins SM (1993) Alveolar macrophage secretion of a 92-kDa gelatinase in response to bleomycin. *Am Physiol Society* 265:581-585.

Doll R (1987) Symposium on MMMF, Copenhagen, October Overview and Conclusions. *Ann Occup Hyg* 31:805-819.

Driscoll KE (2000) TNF  $\alpha$  and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicol Lett* 112-113:177-183.

Driscoll KE, Carter JM, Howard BW, Hassenbein D, Burdick M, Kunkel SL, Strieter RM (1998) Interleukin-10 regulates quartz-induced pulmonary inflammation in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 275:L887-L894.

Driscoll KE, Hassenbein DG, Carter J, Poynter J, Asquith TN, Grant RA, Whitten J, Purdon MP, Takigiku R (1993) Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: expression by rat alveolar macrophages, fibroblasts, and epithelial cells and in rat lung after mineral dust exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Mar;8(3):311-8



Driscoll KE, Lindenschmydh RC, Maurer JK, Higgins JM, Ridder G (1990) Pulmonary response to silica or titanium dioxide: inflammatory cells, alveolar macrophage-derived cytokines, and histopathology. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2:381-390.

Drumm K, Buhl R, Kienast K (1999) Additional NO<sub>2</sub> exposure induces a decrease in cytokine specific mRNA expression and cytokine release of particle and fibre exposed human alveolar macrophages. *Eur J Med Res* 4:59-66.

Drumm K, Oettinger R, Smolarski R, Bay M, Kienast K (1998) In vitro study of human alveolar macrophages inflammatory mediator transcriptions and releases induced by soot FR 101, Prontex 90, titandioxide and Chrysotile B. *Eur J Med Res* 3:432-8.

Drumm K, Schindler H, Buhl R, Kostner E, Smolarski R, Kienast K (1999) Indoor air pollutants stimulate interleukin-8-specific mRNA expression and protein secretion of alveolar macrophages. *Lung* 177:9-19.

Dubois CM, Bissonette E, Rola-Pleszczynski M (1989) Asbestos fibers and silica particles stimulate rat alveolar macrophages to release tumor necrosis factor. *Am Rev Respir Dis* 139:1257-1264.

Dubois CM, Bissonnette E, Rola-Pleszczynski M (1989) Asbestos fibers and silica particles stimulate rat alveolar macrophages to release tumor necrosis factor. Autoregulatory role of leukotriene B<sub>4</sub>. *Am Rev Respir Dis* 139:1257-1264.

Emerson RJ, Davis GS (1983) Effect of alveolar lining material-coated silica on rat alveolar macrophages. *Environ Health Perspect* 51:81-84

Englen MD, Taylor SM, Laegreid WW, et al. (1989) Stimulation of arachidonic acid in silica-exposed alveolar macrophages. *Exp Lung Res* 15:511-526.

Everitt JI, Gelzleichter TR, Bermudez E, Mangum JB, Moss OR, Wong BA, Janszen DB (1997) Comparison of Pleural Responses of Rats and Hamsters to Subchronic Inhalation of Refractory Ceramic Fibers. *Environ Health Perspect* 105S:1209-1213.

Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Felin WG, Lepper H (1995) Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2- stimulation pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature* 373:255-257

Finkelstein MM (2000) Silica, silicosis, and lung cancer: a risk assessment. *Am J Ind Med* 38:8-18.

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1989) Two types of mouse T helper cells. IV: Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170:2081-2095.

Flory CM, Jones ML, Warren JS (1993) Pulmonary granuloma formation in the rat is partially dependent on monocyte chemoattractant protein-1. *Lab Invest* 69:396-404.

Forstermann U, Kleinert H (1995) Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Arch Pharmacol* 352:351-364.

Foss DL, Zilliox MJ, Murtaugh MP (1999) Differential regulation of macrophage interleukin-1 (IL-1), IL-12, and CD80-CD86 by two bacterial toxins. *Infect Immun* 67:5275-5281.

Friedetzky A, Garn H, Kirchner A, Gemsa D (1998) Histopathological changes in the enlarged thoracic lymph nodes during the development of silicosis in rats. *Immunobiology* 199:119-132.

Furie MB, McHugh DD (1989) Migration of neutrophils across endothelial monolayers is stimulated by treatment of the monolayers with interleukin-1 or tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Immunol* 143:3309-3317.

Gagnon L, Filion LG, Dubois C, Rola-Pleszczynski M (1989) Leukotrienes and macrophage activation: augmented cytotoxic activity and enhanced interleukin 1, tumor necrosis factor and hydrogen peroxide production. *Agents Actions* 26:141-147.

Galve-de Rochemonteix B, Nicod LP, Dayer JM (1996) Tumor necrosis soluble receptor 75: The principal receptor form released by human alveolar macrophages and monocytes in the presence of interferon  $\gamma$ . *Am J Respir Cell Mol Biol* 14:279-287.

Garn H, Friedetzky A, Davis GS, Hemenway DR, Gemsa D (1997) T-lymphocyte activation in the enlarged thoracic lymph nodes of rats with silicosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:309-316.

Garn H, Friedetzky A, Kirchner A, Jäger R, Gemsa D (2000) Experimental silicosis: a shift to a preferential IFN- $\gamma$ -based Th1 response in thoracic lymph nodes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:L1221-1230

Gelzleichter TR, Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Janszen DB, Moss OR, Everitt JI (1999) Comparison of pulmonary and pleural responses of rats and hamsters to inhaled refractory ceramic fibers. *Toxicol Sci* 49:93-101.

Gemsa D, Kalden JR, Resch K (1997) *Immunologie*. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Ghio AJ, Kennedy TP, Schapira RM, Crumbliss AL, Hoidal JR (1990) Is lung disease after silicate inhalation caused by oxidant generation? *Lancet* 336:967-969

Gibson ES, McCalla DR, Kaiser-Farrell CK, Kerr AA, Lockington JN, Hertzman C, Rosenfeld JM (1983) Lung cancer in a steel foundry: a search for causation. *JOM* 25: 573-578.

Golde DW, Byers LA, Finley TN (1974) Proliferative capacity of human alveolar macrophages. *Nature* 247:373-375.

Goldsmith DF (1997) Evidence for silica's neoplastic risk among workers and derivation of cancer risk assessment. *Expo Anal Environ Epidemiol* 7:291-301.

Gossart S, Cambon C, Orfila C, Seguelas MH, Lepert JC, Rami J, Carre P, Pipy B (1996) Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF  $\alpha$  production in rat lung inflammation induced by silica. *J Immunol* 156:1540-1548.

Gourmala NG, Buttini M, Limonta S, Sauter A, Boddeke HW (1997) Differential and time-dependent expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA by astrocytes and macrophages in rat brain: effects of ischemia and peripheral lipopolysaccharide administration. *J Neuroimmunol* 74:35-44.

Graham WGB (1992) Silicosis. *Clin Chest Med* 13:253-267.

Green FHY, Althouse R, Weber KC (1989) Prevalence of silicosis at death in underground coal miners. *Am J Ind Med* 16:605-615.

Green FHY, Laqueur WA (1980) Coal workers' pneumoconiosis. *Pathol Ann* 15:333-409.

Griess JP (1879) *Ber Deutsch Ges* 12, 426.

Griscavage JM, Rogers NE, Sherman MP, Ignarro LJ (1993) Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J Immunol* 151:6329-6337.

Gross GN, Rehm SR, Pierce AK (1978) The effect of complement depletion on lung clearance of bacteria. *J Clin Invest* 62:373-378.

Gross P, Hatsch T (1962) Pneumoconiosis: The requirement for lymphatic dust transport. *Intern Arch Gewerbepath. Gewerbehyg* 16:660-666.

Gross P, Kaschak M, Tolker EB, et al. (1970) The pulmonary reaction to high concentration of fibrous glass dust. *Arch Env Health* 20: 696-704.

Gu L, Rutledge B, Fiorillo J, Ernst C, Grewal I, Flavell R, Gladue R, Rollins B (1997) In vivo properties of monocyte chemoattractant protein-1. *J Leuk Biol* 62:577-580

Guoping C, Fan P, Jingxi S, Xiaoping L, Shiqin J, Yuri L (1997) Purification and characterization of a silica-induced bronchoalveolar lavage protein with fibroblast growth-promoting activity. *J Cell Biochem* 67:257-264.

Gusev VA, Danilovskaja YeV., Vatulkina O, Lomonosova OS, Velichkovsky BT (1993) Effect of quartz and alumina dust on generation of superoxide radicals and hydrogen peroxide by alveolar macrophages, granulocytes, and monocytes. *Br J Ind Med* 50:732-735

Held TK, Weihua X, Yuan L, Kalvakolanu DV, Croo AS (1999) Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Infect Immun* 67:206-212.

Helmke RJ, Boyd RL, German VF, Mangos JA (1987) From growth factor dependence to growth factor responsiveness: the genesis of an alveolar macrophage cell line. *In Vitro Cell Dev Biol* 23:567-574.

Hemenway DR, Absher MP, Trombley L, Vacek PM (1990) Comparative clearance of quartz and cristobalite from the lung. *Am Ind Hyg Assoc J* 51:363-369.

Henderson WR (1987) Eicosanoids and lung inflammation. *Am Rev Respir Dis* 135:1176-1185.

Heppleston AG (1972) The pathological recognition and pathogenesis of emphysema and fibrocystic disease of the lung with special reference to coal workers. *Ann NY Acad Sci* 200:347-369.

Hessel PA, Gamble JF, Gee JB, Giccs, G, Green FH, Morgan WK, Mossman BT (2000) Silica, ilcosis, and lung cancer: a response to a recent working group report. *J Occup Environ Med* 42:704-720.

Hesterberg TW, Müller WC, Mast R, McConnell EE, Bernstein DM, Anderson R (1994) Relationship between lung biopersistence and biological effects of man-made vitreous fibers after chronic inhalation in rats. *Environ Health Perspect* 5:133-137.

Hill IM, Beswick PH, Donaldson K (1996) Enhancement of the macrophage oxidative burst by immunoglobulin coating of respirable fibers: fiber-specific differences between asbestos and man-made fibers. *Exp Lung Res* 22:133-148.

Henzido E, Sluis-Cremer GK (1993) Risk of silicosis in a cohort of white South African gold miner. *Am J Ind Med* 24:447-457.

Holland LM (1990) Crystalline silica and lung cancer: A review of recent experimental evidence. *Reg Toxicol Pharmacol* 12:224-237.

Holley JA, Janssen YM, Mossman BT, Taatjes DJ (1992) Increased manganese superoxide dismutase protein in type II epithelial cells of rat lungs after inhalation of crocidolite asbestos or cristobalite silica. *Am J Pathol* 141:475-485.

Holt PG, Haining S, Nelson DJ, Sedgwick JD (1994) Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. *J Immunol* 153:256-261.

Holt PG, Schon-Hegrad MA, Oliger J (1988) MHC class II-antigen-bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat. *J Exp Med* 167:262-274.

Hook GER (1991) Alveolar proteinosis and phospholipidoses of the lungs. *Toxic Pathol* 19:482-513.

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM (1993) Development of Th CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260:547-549.

Huaux F, Louahed J, Hudspith B, Meredith C, Delos M, Renauld JC, Lison D (1998) Role of interleukin-10 in the lung response to silica in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:51-59.

Huaux F, Louahed J, Hudspith B, Meredith C, Delos M, Renauld J-C, Lison D (1998) Role of interleukin-10 in the lung response to silica in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:51-58.

Hunter D (1985) *The Diseases of Occupations*, 5<sup>th</sup> ed. London: The English Universities Press, 915-1020.

ILSI Risk Science Institute WP (2000) *The Relevance of the Rat Lung Response to Particle Overload for Human Risk Assessment: A Workshop Consensus Report*. *Inhal Toxicol* 12:1-17.

International Agency for Research on Cancer (1987) *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. Vol. 42. Lyon, IARC, 111.

International Labor Office (1980) *Guidelines for the Use of the International Classification of Radiographs of the Pneumoconiosis*, rev ed. International Labor Office, Occupational Safety and Health Series No. 22 (Ref. Revision 80) Geneva: International Labor Office.

Isler P, Galve-de Rochemonteix B, Songeon F, Boehringer N, Nicod P (1999) Interleukin-12 production by human alveolar macrophages is controlled by the autocrine production of interleukin-10. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:270-278.

Ives JC, Buffler PA, Greenberg SD (1983) Environmental associations and histopathologic patterns of carcinoma of the lung. *Am Rev Respir Dis* 128:195-209.

Iyer R, Hamilton RF; Li L, Holian A (1996) Silica-induced apoptosis mediated via scavenger receptor in human alveolar macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* 141:84-92.

Jagirdar J, Begin R, Dufresne A, Goswami S, Lee TC, Rom WN (1996) Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1076-1081.

James WRL (1954) The relationship of tuberculosis to the development of massive pneumoconiosis in coal workers. *Br J Tuber* 48:89-101.

Janssen YM, Marsh JP, Absher MP, Hemenway J, Vacek PM, Leslie KO, et al. (1992) Expression of antioxidant enzymes in rat lungs after inhalation of asbestos or silica. *Journal of Biological Chemistry* 267:10625-10630.

Janssen YM, Marsh JP, Driscoll KE, Borm PJ, Oberdorster G, Mossman BT (1994) Increased expression of manganese-containing superoxide dismutase in rat lungs after inhalation of inflammatory and fibrogenic minerals. *Free Radic Biol Med* 16:315-22.

Jensen CG, Watson M (1999) Inhibition of cytokinesis by asbestos and synthetic fibres. *Cell Biol Int* 23:829-40.

Jesch NK, Dörger M, Schütze E, Krombach F, Messmer K (1996) Species differences in iNOS expression and NO formation by rat hamster, monkey, and human alveolar macrophages in vitro. Abstract 120: The Sixth International Meeting on the Toxicology of Natural and Man-Made Fibrous and Non-Fibrous Particles. Lake Placid, New York.

Jiang Y, Beller DI, Frendl G, Graves DT (1992) Monocyte chemoattractants protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 148:2423-2428.

Kampschmidt RF, Worthington ML, Mesecher MI (1986) Release of interleukin-1 (IL-1) and IL-1-like factors from rabbit macrophages with silica. *L Leukoc Biol* 39:123-132.

Kawami M, Ebihara I (2000) Cytogenetic damage and cell-mediated immunity in pneumoconiosis. *Environ Pathol Toxicol Oncol* 19:103-108.



Kern JA, Lamb RJ, Reed JC, Elias JA, Daniele RR (1988) Interleukin-1- $\beta$  gene expression in human monocytes and alveolar macrophages from normal subjects and patients with sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 137:1180-1184

Kim JK, Lee WK, Lee EJ, Cho YJ, Lee KH, Kim HS, Chung Y, Kim KA, Lim Y (1999) Mechanism of silica- and titanium dioxide-induced cytotoxicity in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health A* 10;58(7):437-50

Kim KA, Lee WK, Kim JK, Seo MS, Lim Y, Lee KH, Chae G, Lee SH, Chung Y (2001) Mechanism of refractory ceramic fiber- and rock wool-induced cytotoxicity in alveolar macrophages. *Int Arch Occup Environ Health* 74(1):9-15

Kim YM, Talanian RV, Li J, Billiar TR (1998) Nitric oxide prevents IL-1  $\beta$  and IFN  $\gamma$  inducing factor (IL-18) release from macrophages by inhibiting caspase-1 (IL-1 $\beta$ -converting enzyme). *J Immunol* 161:4122-4128.

Kohayama N (1997) Length-reduction method for man-made mineral fibers for biological experiments. *Ind Health* 35, 126-134.

KOHYAMA N, Tanaka I, Tomita M, Kudo M, Shinohara Y (1997) Preparation and Characteristics of JFM Standard Reference Samples of Fibrous Minerals for In Vitro Experiments. *Ind Health* 35:415-432.

Kumar RK (1989) Quantitative immunohistologic assessment of lymphocyte populations in the pulmonary inflammatory response to intratracheal silica. *Am J Pathol* 135:605-614.

Kumar RK, Li W, O'Grady R (1990) Activation of lymphocytes in the pulmonary inflammatory response to silica. *Immunol Invest* 19:363-372.

Kunkel SL, Chensue SW, Mouton C, Higashi GI (1984) Role of lipoxygenase products in murine pulmonary granuloma formation. *J Clin Invest* 74:514-524.

Lauweryns JM, Baert JH (1977) Alveolar clearance and the role of the pulmonary lymphatics. *AM Rev Respir Dis* 115: 625-683.

LeBouffant LL, Daniel H, Henin JP, et al. (1987) Experimental study on long-term effects of inhaled MMMF on the lungs of rats. *Ann Occup Hyg* 31:765-790.

LeFevre ME, Green FHY, Joel DO, Laquer W (1982) Frequency of black pigment in liver and spleen of coal workers. *Hum Pathol* 13:1121-1126.

Leikauf GD, Fink SP, Miller ML, Lockey JE, Driscoll KE (1995) Refractory ceramic fibers activate alveolar macrophage eicosanoid and cytokine release. *J Appl Physiol* 78:164-171.

Leonard JP, Waldburger KE, Schaub RG, Smith T, Hewson AK, Cuzner ML, Goldman SJ (1997) Regulation of the inflammatory response in animal models of multiple sclerosis by interleukin-12. *Crit Rev Immunol* 17:545-553.

Lesur O, Cantin AM, Transwell AK, Melloni B, Beaulieu JF, Begin R (1992) Silica exposure induces cytotoxicity and proliferative activity of type II pneumocytes. *Experimental Lung Research* 18:173:190.

Lewen, A (1997) Molekularbiologische Charakterisierung der Ratten-Makrophagen-Zelllinie R2 und NR8383 und Untersuchung des Einflusses ausgewählter Fasern und Partikel auf die Genexpression von R2 Makrophagen. Diplomarbeit im Studiengang Humanbiologie.

Li W, Kumar RK, O'Grady R, Velan GM (1992) Role of lymphocytes in silicosis: regulation of secretion of macrophage-derived mitogenic activity for fibroblasts. *Int J Exp Pathol* 73:793-800.

Liu B, Guan R, Zhou P, Mio Q, Wang H, Fu D, You B (2000) A distinct mutational spectrum of p53 and K-ras genes in lung cancer of workers with silicosis. *Environ Pathol Toxicol Oncol* 19:1-7.

Lockey J, Lemasters G, Rice C, Hansen K, Levin L, Shipley R, Spitz H, Wiot J (1996) Refractory ceramic fiber exposure and pleural plaques. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1405-1410.

Lohmann-Matthes ML, Steinmüller C, Franke-Ullmann G (1994) Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 7:1678-1689.

MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323-350.

Mariani TJ, Alikhan MC, Pierce RA (1999) Fibroblast tropoelastin and  $\alpha$ -smooth-muscle actin expression are repressed by particulate-activated macrophage-derived tumor necrosis factor- $\alpha$  in experimental silicosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:185-92.

Mariani TJ, Sandefur S, Roby JD, Pierce RA (1998) Collagenase-3 induction in rat lung fibroblasts requires the combined effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  and 12-lipoxygenase metabolites: a model of macrophage-induced, fibroblast-driven extracellular matrix remodeling during inflammatory lung injury. *Mol Biol Cell* 9:1411-24.

Marks-Konczalik J, Gillissen A, Jaworska M, Loseke S, Voss B, Fisseler-Eckhoff A, Schmitz I, Schultze-Werninghaus G (1998) Induction of manganese superoxide dismutase gene expression in bronchoepithelial cells after rockwool exposure. *Lung* 176:165-180.

Martin TR, Altman LC, Alvert RK, Henderson WR (1984) Leukotriene B<sub>4</sub> production by the human alveolar macrophage: a potential mechanism for amplifying inflammation in the lung. *Am Rev Respir Dis* 129:106-111.

McConnell EE (1994) Synthetic vitreous fibers-inhalation studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 20:S22-34.

McConnell EE, Axten C, Hesterberg TW, Chevalier J, Müller WC, Everitt J, Oberdorster G, Chase GR, Thevenaz P, Kotin P (1999) Studies on the Inhalation Toxicology of Two Fiberglasses and Amosite Asbestos in the Syrian Hamster. Part II. Results of Chronic Exposure. *Inhal Toxicol* 11:785-835.

McConnochie K, Green FHY, Vallyathan V, Wagner JC, Seal RME (1988) Interstitial fibrosis in coal workers - Experience in South Wales and West Virginia. *Ann Occup Hyg* 32:553-560.

McDonald JC (1990) Cancer risks due to asbestos and man-made fibres. *Recent Results Cancer Res* 120:122-133.

McDonald JC, Case BW, Enterline PE, et al. (1990) Lung dust analysis in the assessment of past exposure of man-made mineral fibre workers. *Ann Occup Hyg* 34:427-441.

Melloni B, Lesur O, Bouhadiba T, Cantin A, Martel M, Begin R (1996) Effect of exposure to silica on human alveolar macrophages in supporting growth activity in type II epithelial cells. *Thorax* 51:781-786.

Merrill WW, Naegel GP, Olchowski JJ, Reynolds HY (1985) Immunoglobulin G subclass proteins in serum and lavage fluid of normal subjects: Quantitation and comparison with immunoglobulins A and E. *Am Rec Respir Dis* 131:584-591.

Meyers Enzyklopädisches Lexikon (1971)

Mohr C, Davis GS, Graebner C, Amann S, Hemenway DR, Gemsa D (1992) Reduced release of leukotrienes B4 and C4 from alveolar macrophages of rats with silicosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7: 542-547.

Mohr C, Davis GS, Graebner C, Hemenway DR, Gemsa D (1992) Enhanced release of prostaglandin E2 from macrophages of rats with silicosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6:390-396.

Mohr C, Gemsa D, Graebner C, Hemenway DR, Leslie KO, Absher PM, Davis GS (1991) Systemic macrophage stimulation in rats with silicosis: Enhanced release of tumor necrosis factor- $\alpha$  from alveolar and peritoneal macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5:395-402

Morel PA, Oriss TB (1998) Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Crit Rev Immunol* 18:275-303.

Morgan WKC, Seaton A (1984) *Occupational Lung Diseases*, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders.

Muhle H, Mangelsdorf (2003) Inhalation toxicity of mineral particles: critical appraisal of endpoints and study design. *Toxicol Lett* 140-141: 223-228

Murray J, Reid G, Kielkowski D, DeBeer M (1993) Cor pulmonale and silicosis: An autopsy based case control study. *Br J Ind Med* 50:544-548.

Murray J, Webster I, Reid G, Kielkowski D (1991) The relation between fibrosis of hilar lymph glands and the development of parenchymal silicosis. *Br J Ind Med* 48:267-269.

Musselman RP, Müller WC, Eastes W, Hadley JG, Kamstrup O, Thevenaz P, Hesterberg TW (1994) Biopersistences of man-made vitreous fibers and crocidolite fibers in rat lungs following short-term exposures. *Environ Health Perspect* 5:139-143.

Nagelschmidt G (1960) The relation between lung dust and lung pathology in pneumoconiosis. *Br J Ind Med* 17:247-259.

Nario RC, Hubbard AK (1997) Localization of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in the lungs of Silica-exposed Mice. *Environ Health Perspect* 105S:1183-90.

Nathan CF, Hibbs JB Jr. (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin Immunol* 3:65

Nau GJ, Guilfoile P, Chupp GL, Berman JS, Kim SJ, Kornfeld H, Young RA (1997) A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6414-6419.

Nicod LP (1999) Pulmonary defence mechanisms. *Respir* 66:2-11

Nicod LP, El Habre F, Dayer JM, Boehringer N (1995) Interleukin-10 decreases tumor necrosis factor  $\alpha$  and  $\beta$  in alloreactions induced by human lung dendritic cells and macrophages. *Am J Respir Cell Biol* 13:83-90.

Nicod LP, Isler P (1997) Alveolar macrophages in sarcoidosis coexpress high levels of CD86 (B7.2), CD40 and CD30L. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:91-96.

Nyberg P, Klockars M (1990) Quartz-induced production of reactive oxygen metabolites by activated human monocyte-derived macrophages. *APMIS* 98:823-827

Oberdorster G (2000) Determinants of the pathogenicity of man-made vitreous fibers (MMVF). *Int Arch Occup Environ Health* 73 Suppl:S60-8

Oberdorster G (2001) Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health* 74(1):1-8.

Obermeier F, Gross V, Scholmerich J, Falk W (1999) Interleukin-1 production by mouse macrophages is regulated in a feedback fashion by nitric oxide. *J Leukoc Biol* 66:829-836.

Oghiso Y, Kubota Y (1986) Enhanced interleukin 1 production by alveolar macrophages and increase in Ia-positive lung cells in silica-exposed rats. *Microbiol Immunol* 30:1189-1198.

Onofrio JM, Toews GB, Lipscomb MF, Pierce A (1983) Granulocyte-alveolar macrophage interactions in the pulmonary clearance of *Staphylococcus aureus*. *Am Rev Respir Dis* 127:335-341.

Ortmeyer CE, Costello J, Morgan WKC, Sweeckers S, Peterson MR (1974) The mortality of Appalachian coal miners. *Arch Env Hlth* 29:67-72.

Pabst R (1992) Is BALT a major component of the human lung immune system? *Immunol Today* 13:119-122.

Paul (1999) *Fundamental Immunology*, Fourth Edition Lippincott – Raven publishers, Philadelphia, New York

Peters- Golden M, McNish RW, Hyzy R, Shelly C, Toews GB (1990) Alterations in the pattern of arachidonate metabolism accompany rat macrophage differentiation in the lung. *J Immunol* 144:263-270.

Phan SH, Kunkel SL (1986) Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by nordihydroguaiaretic acid: the role of alveolar macrophage activation and mediator production *Am J Pathol* 124:343-352.

Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Sappino AP, Vassalli P (1990) Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature* 344:245-247.

Piguet PF, Vesin C (1994) Treatment by human recombinant soluble TNF receptor of pulmonary fibrosis induced by bleomycin or silica in mice. *Eur Respir J* 7:515-518.

Pintar K, Funahashi A, Siegesmund A (1976) A diffuse form of pulmonary silicosis in foundry workers. *Arch Pathol Lab Med* 100:535-538.

Poole A (1985) Measurements of enzymes of collagen synthesis in rats with experimental silicosis. *Br J Exp Pathol* 66:89-94.

Poole A, Myllyla R, Wagner JC, Brown RC (1985) Collagen biosynthesis enzymes in lung tissue and serum of rats with experimental silicosis. *Br J Exp Pathol* 66:567-575.

Pott F (1978) Some aspects on the dosimetry of the carcinogenic potency of asbestos and other fibrous dust. *Staub-Reinhalt* 38, 486-90.

Pott F (1980) Animal experiments on biological effects of mineral fibers. In: Wagner JC, ed. *Biological Effects of Mineral Fibres*, IARC Sci. Publ. No. 30 Lyon, 261-70.

Pschyrembel (1990) *Klinisches Wörterbuch*. De Gruyter Verlag 256:1234.

Reiser KM, Hesterberg TW, Haschek WM, Last JA (1982) Experimental silicosis. I. Acute effects of intratracheally instilled quartz on collagen metabolism and morphologic characteristics of rat lungs. *Am J Pathol* 107:176

Reynolds HY (1987) Bronchoalveolar lavage (state of art). *Am Respir Dis* 135:20-263.

Riede UN, Schaefer HE (1993) *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart • New York 641-644.

Robertson J, Coldwell JR, Castle JR, Waldman RH (1976) Evidence for the presence of components of the alternative (properdin) pathway of complement activation in respiratory secretions. *J Immunol* 117:900-903.

Rogers RA, Antonini JM, Brismar H, Lai J, Hesterberg TW, Oldmixon EH, Thevenaz P, Brain JD (1999) In situ microscopic analysis of asbestos and synthetic vitreous fibers retained in hamster lungs following inhalation. *Environ Health Perspect* 107:367-375.

Rojanasakul Y, Ye J, Chen F, Wang L, Cheng N, Castranova V, Vallyathan V, Shi X (1999) Dependence of NF $\kappa$ B activation and free radical generation on silica-induced TNF- $\alpha$  production in macrophages. *Mol Cell Biochem* 200:119-125.



Rosenman KD, Moore-Fuller M, Reilly MJ (2000) Kidney disease and silicosis. *Nephron* 85:14-19.

Ross HF, King EJ, Huginthem N, Nagelschmidt H (1962) Inhalation experiments with coal dust containing 5%, 10%, 20% and 40% quartz: Tissue reactions in the lungs of rats. *Anal Occup Hyg* 5:149-161.

Ruegger M (1996) Are artificial mineral fibers harmful to health and unsuitable for asbestos substitute ? *Schweiz Rundsch Med Prax* 85:961-966.

Ruotsalainen M, Hirvonen MR, Luoto K, Savolainen KM (1999) Production of reactive oxygen species by man-made vitreous fibers in human polymorphonuclear leukocytes. *Hum Exp Toxicol* 18:354-362.

Russel AE, Britten RH, Thompson LR, Bloomfield JJ (1929) The health of workers in dusty trades. II. Exposure to siliceous dust (granite industry). Washington, D.C. USGPO: Public Health Bulletin No. 269.

Sali D, Boffetta P, Andersen A, Cherrie JW, Claude JC, Hansen J, Olsen JH, Pesatori AC, Plato N, Reppo L, Westerholm P, Winter P, Saracci R (1999) Non-neoplastic mortality of European workers who produce man-made-vitreous fibres. *Occup Environ Med* 56:612-617.

Sanderson MJ, Charles AC, Boitano S, Dirksen ER (1994) Mechanisms and function of intercellular calcium signaling. *Mol Cell Endocrinol* 98:173-187.

Sanderson MJ, Chow I, Dirksen ER (1988) Intercellular communication between ciliated cells in culture. *Am J Physiol* 254:C63-C74.

Schall TJ, Bacon KB (1994) Chemokines, leukocyte trafficking and inflammation. *COI* 6 865-873.

Schensue SW, Terebuh PD, Warmington KS, Hershey SD, Evanoff HL, Kunkel SL, Higashi GI (1992) Role of IL-4 and IFN  $\gamma$  in *Schistosoma mansoni* egg- induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution , and relationship to macrophage function. J Immunol 148:900-906.

Schepers GWH (1959) Pulmonary histological reactions to ingaled fibrous glass-plastic dust. Am J Pathol 35: 1169-1183.

Schmidt JA, Oliver CN, Lepe Ziniga JL, Green I, Gery I. (1984) Silica-stimulated monocytes release fibroblast proliferation factors identical to interleukin 1. A potential role of interleukin 1 in the pathogenesis of silicosis. J Clin Invest 73:1462-1472.

Schwertschlag US, Trepicchio WL, Dykstra KH, Keith JC, Turner KJ, Dorner AJ (1999) Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11. Leukemia 13:1307-1315.

Sertl K, Takemura T, Tschachler E, Ferrans VJ, Kaliner MA, Shevach EM (1986) Dendritic cells with antigen presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma and visceral pleura. J Exp Med 163:436-451.

Shennan DH, Washington JS, Thomas DJ, et al. (1981) Factors predisposing to the development of PMF in coal miners. Br J Indust Med 38:321-326.

Sibille Y, Reynolds HY (1990) Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. Am Rev Respir Dis 141:471-501.

Sjostrand M, Absher PM, Hemenway DR, Trombley L, Baldor LC (1991) Comparison of lung alveolar and tissue cells in silica-induced inflammation. Am Rev Respir Dis 143:47-52.

Soutar CA, Robertson A, Miller BG, Searl A, Bignon J (2000) Epidemiological evidence on the carcinogenicity of silica factors in scientific judgement. Ann Occup Hyg 44:3-14.

Spech RW, Wisniowski P, Kachel DL, Wright JR, Martin WJ (2000) Surfactant protein A prevents silica-mediated toxicity to rat alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:713-718.

Sporn PHS, Murphy TM, Peters-Golden M (1990) Complex effects of in vitro hyperoxia on alveolar macrophage arachidonic acid metabolism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2:81-90.

Stanton MF, Layard M (1978) The carcinogenicity of fibrous material. In: Gravett CC, LaFleur PD, Heinrichs KFJ, eds. *Workshop on Asbestos: Definition and Measurement Methods*. National Bureau of Standards, Special Publication No. 506, Washington, DC, 143-51.

Stanton MF, Layard M, Tegeris A, et al (1977) Carcinogenicity of fibrous glass: Pleural response in the rat in relation to fibre dimension. *J Nat Can Inst* 58:587-597.

Stanton MF, Layard M, Tegeris A, Miller E, May M, Morgan F, Smith A (1981) Relation of particle dimension to carcinogenicity in amphibole asbestos and other fibrous material. *JNCI* 67, 965-75.

Steenland K, Stayner K (1997) Silica, asbestos, man-made mineral fibers, and cancer. *Cancer Causes Control* 8:491-503.

Stenback F, Rowland J, Sellakumar A (1976) Carcinogenicity of benzo(a)pyrene and dusts in the hamster lung instilled intratracheally with titanium oxide, aluminum oxide, carbon, and ferric oxide. *Oncology* 33:29-34.

Stokinger HE (1984) A review of world literature finds iron oxides noncarcinogenic. *Am Ind Hyg Assoc J* 45:127-133.

Stringer B, Kobzik L (1998) Environmental particulate-mediated cytokine production in lung epithelial cells (A549): role of preexisting inflammation and oxidant stress. *J Toxicol Environ Health* 55:31-44.

Struhar D, Harbeck RJ (1986) Anti-Ia antibodies inhibit the spontaneous secretion of IL-1 from silicotic rat alveolar macrophages. *Immunol Lett* 23:31-34.

Struhar D, Harbeck RJ, Mason RJ (1989) Lymphocyte populations in lung tissue, bronchoalveolar lavage fluid, and peripheral blood in rats at various times during the development of silicosis. *Am Rev Respir Dis* 139:28-32

Struhar DJ, Harbeck RJ, Gegen N, Kawada H, Mason RJ (1989) Increased expression of class II antigens of the major histocompatibility complex on alveolar macrophages and alveolar type II cells and interleukin-1 secretion from alveolar macrophages in an animal model of silicosis. *Clin Exp Immunol* 77:281-284.

Suzuki Y, Kohyama N (1984) Malignant mesothelioma induced by asbestos and zeolite in the mouse peritoneal cavity. *Environ Res* 35, 277-292.

Tayeh MA and Marletta MA (1989) Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate: tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem* 264:19654.

Thepen T, Claassen E, Hoebe K et al. (1993) Migration of alveolar macrophages from alveolar space to paracortical T cell area of the draining lymph node. *Adv Exp Med Biol* 329:305-310.

Thurlbeck WM, Churg AM (1995) *Pathology of the lung* 2<sup>nd</sup> Ed. Thieme Medical Publishers, Inc., New York. Georg Thieme Verlag Stuttgart•New York 850-914.

Ungar J, Wilson GR (1985) Monocytes as a source of alveolar macrophages. *Am J Pathol* 11:681-691.

Vallone FH, Franklin M, Sun GG et al. (1985) Alveolar macrophage lipoxygenase products of arachidonic acid: Isolation and recognition as the predominant constituents of the neutrophil chemotactic activity elaborated by alveolar macrophages. *Cell Immunol* 54:390-401.

Vallyathan V, Castranova V, Pack D, Leonard S, Shumaker J, Hubbs AF, Shoemaker DA, Ramsey DM, Pretty JR, McLaurin JL, et al. (1995) Freshly fractured quartz inhalation leads to enhanced lung injury and inflammation. Potential role of free radicals. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 1003-1009.

Vallyathan V, Mega JF, Shi X, Dalal NS (1992) Enhanced generation of free radicals from phagocytes induced by mineral dusts. *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology* 6:404-413

Vigliani ED, Mottura G (1948) Diatomaceous earth silicosis. *Br. J Ind* 4: 148-160.

Vu-Duc T, Guillemin M (1999) Switzerland: the status of silicosis from the past to the end of the 20<sup>th</sup> century. Control and prevention. *Soz Präventivmed* 44:184-190.

Wagner JC, Berry G, Timbrell V (1973) Mesothelioma in rats after inoculation with asbestos and other materials. *Br J Cancer* 28:175-185.

Wagner JC, Gubbs AR (1988) diseases due to synthetic mineral fibers. Churg A, Green FHY (eds): *Pathology of Occupational Lung Disease*. New York: Igaku-Shoin, 327-330.

Wallace WE, Jr., Vallyathan V, Keane MJ, Robinson V (1985) In vitro biologic toxicity of native and surface-modified silica and kaolin. *Journal of Toxicology & Environmental Health* 16:415-424.

Warheit DB, George G, Hill LH, Snyderman R, Brody AR (1985) Inhaled asbestos activates a complement-dependent chemoattractant for macrophages. *Lab Invest* 52:505-514

Warner AE, Barry BE, Brain JD (1986) Pulmonary intracascular macrophages in sheep. Morphology and function of a novel constituent of the mononuclear phagocyte system. *Lab Invest* 55:276-288.

Warner AE, Molina RM, Brain JD (1987) Uptake of blood-borne bacteria by pulmonary intravascular macrophages and consequent inflammatory responses in sheep. *Am Rev Respir Dis* 136:683-690.

Warshawsky D, Reilman R, Cheu J, Radike M, Rice C J (1994) Influence of particle dose on the cytotoxicity of hamster and rat pulmonary alveolar macrophage in vitro. *Toxicol Environ Health* 42(4):407-21

Washawsky D, Bingham E, Niemeier RW (1983) Influence of airborne particulate on the metabolism of benzo(a)pyrene in the isolated perfused lung. *J Tox Environ Hlth* 11:503-517.

Weill H, Hughes JM, Hammad YY, Glindmeyer HW, Sharon G, Jones RN (1983) Respiratory health in workers exposed to man-made vitreous fibers. *Am Rev Respir Dis* 128:104-112.

Welch K, Higgins I, Oh M, Burchfiel C (1982) Arsenic exposure, smoking, and respiratory cancer in copper smelter workers. *Arch Environ Hlth* 37:325-335.

Widdicombe JG (1995) Relationship between the composition of mucus, epithelial lining liquid, and adhesion of micro-organisms. *Am J Crit Care Med* 151:2088-2093.

Williams AO, Knapton AD (1996) Hepatic silicosis, cirrhosis, and liver tumors in mice and hamsters: studies of transforming growth factor  $\beta$  expression. *Hepatology* 23:1268-75.

Winston BW, Krein PM, Mowat C, Huang Y (1999) Cytokine-induced macrophage differentiation: a tale of 2 genes. *Clin Invest Med* 22:236-255.

Wojtczak J (1994) Exposure to ceramic fibers in the occupational environment. I. Production, kinds of ceramic fibers, changes in structure of these fibers, preliminary studies in the working environment. *Med Pr* 45:479-486.

Yu CP, Zhang L, Oberdorster H, Mast RW, Glass LR, Utell MJ (1994) Clearance of refractory ceramic fibers (RCF) from the rat lung: development of a model. *Environ Res* 65:243-253.

Zhang Q, Kusaka Y, Sato K, Nakakuki K, Kohyama N, Donaldson K (1998) Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. *Toxicol Environ Health* 53:423-438.

Zhang Z, Shen HM, Zhang QF, Ong CN (2000) Involvement of oxidative stress in crystalline silica-induced cytotoxicity and genotoxicity in rat alveolar macrophages. *Environ Res* 82(3):245-52

Zoller T, Zeller WJ (2000) Production of reactive oxygen species by phagocytic cells after exposure to glass wool and stone wool fibres - effect of fibre preincubation in aqueous solution. *Toxicol Lett* 114:1-9.

Zwilling BS, Campolito LB, Reiche NA (1982) Alveolar subpopulations identified by differential centrifugation on a discontinuous albumin density gradient. *Am Rev Respir Dis* 125:448-452.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

In Marburg:

Arnold, Basler, Baum, Bautz-Holzherr, Beato, Christiansen, Daut, Engel, Eschenbach, Fuhrmann, Ganz, Garn, Gemsa, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Habermehl, Happle, Hasili, Hesse, Huffmann, Kern, Klenk, Klose, Koolmann, Kraus, Krieg, Kummer, Kälble, Lang, Lennartz, Maisch, Mannherz, Oertel, Pohlen, Remschmidt, Riedmiller, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schnabel, Schulz, Seifart, Steininger, Stiletto, Stinner, Thomas, Vohland, Werner, Westermann, Wichert v.

In Kassel:

Pausch, Tryba

In Sarnen, Schweiz:

Müller



Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, ihnen allen gebührt mein herzlichster Dank.

An erster Stelle möchte ich Frauke danken. Unermüdlich hat sie mich ermuntert, aufgebaut und mit mir gelitten, als Mycoplasmen die Früchte der Arbeit zu vereiteln drohten. Ihr gebührt ein besonderer Dank, vor allem über ihre Freude, als sie von der Abgabe der Dissertation erfuhr.

Meinen Eltern Jutta und Michael danke ich dafür, daß sie mir dieses Studium ermöglicht haben. Sie waren maßgeblich daran beteiligt, daß ich mir keine Sorgen machen musste und mich ausschließlich dem Studium und der Dissertation widmen konnte.

Meinen lieben Freunden Anke und Heiner möchte ich für die große emotionale Unterstützung und fachliche Hilfestellungen danken. Durch sie war jeder Tag im Labor immer etwas besonderes.

Ich danke meinem Betreuer Holger. Ohne ihn hätte ich nicht zu meinem Thema der Doktorarbeit und zum Forschungsgebiet mineralische Fasern und Makrophagen gefunden. Durch ihn habe ich während der Labortätigkeit und während des Verfassens der Dissertation sehr viel gelernt.

Auch bin ich Herrn Gerns zu Dank verpflichtet, daß er mich in seinem Institut als Doktorand angenommen hat. Insbesondere werden die Arbeitstreffen, der Geruch der Pfeife und die Wanderungen im Klein-Walsertal in meiner Erinnerung bleiben.

Ich möchte den Menschen danken, die mich in meiner Zeit im Labor begleitet haben und dafür gesorgt haben, daß ich mich stets willkommen gefühlt habe. Insbesondere möchte ich mich hier bei Ute, Marion, Marianne, Christof, Michael, Andreas und Claudia bedanken.

Vielen Dank an die Personen, die sich unermüdlich durch die Wirrungen der Rohfassungen der Disseration kämpften und die zahlreichen Fehlerteufelchen ausmerzten. Zu nennen sind da Bernd, Christian, Sönke, Nikola und Frauke.

Last but not least, danke ich meiner lieben Mitstreiterin Anja. Durch ihre unendliche Energie und Lebensfreude ist meine Zeit im Labor wie im Fluge vergangen.